

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

**RÔLE DU RÉCEPTEUR DES HYDROCARBURES AROMATIQUES  
CHEZ LES CELLULES T AUXILIAIRES DANS LE CONTRÔLE DE LA  
RÉPONSE IMMUNITAIRE**

Par  
Debbie Lim

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

**Jury d'évaluation**

Examinatrice externe

Laurence Terrisse-Rulleau  
CTI Life Sciences

Examinatrice interne

Cathy Vaillancourt  
INRS-Institut Armand-Frappier

Directeur de recherche

Jacques Bernier  
INRS-Institut Armand-Frappier



## REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord grandement remercier mon directeur de recherche, Dr Jacques Bernier, de m'avoir accepté comme étudiante à la maîtrise et de m'avoir donné ce merveilleux projet. J'ai vraiment aimé l'autonomie que vous m'avez accordé au long de ce projet, que se soit dans la planification des expériences ou dans les différentes voies à explorer, la liberté de prendre beaucoup de décisions a été gratifiante. Ce projet a pris du temps à porter fruit, mais vous aviez toujours été patient et disponible pour répondre à toutes mes questions. Je ne vais jamais non plus oublier comment que vous m'avez taquiné à chaque occasion possible, ce qui a aidé à me sortir de la gêne et à rendre mes 2 années de maîtrise très amusantes. Merci aussi d'avoir été patient avec la rédaction de ce mémoire.

J'aimerais ensuite remercier Bruno Johnson, le vétéran du labo, avec sa patience quasiment inépuisable. Il a été une personne de ressource indispensable au cours de ma maîtrise, sans qui j'aurais eu beaucoup de difficulté à retrouver des choses dans le labo et à calculer des concentrations plus difficiles que la règle de trois. Je tiens aussi à remercier Marlyse et Guillaume qui m'ont beaucoup aidé lors de mon stage avant le début de ma maîtrise et qui ont rendu mon expérience de recherche assez amusante pour que je revienne faire une maîtrise.

Ensuite, j'aimerais remercier tous mes amis dans notre bureau commun: Elham, Natasha, Mélanie, Laetitia, Lucas, Alex, Ahmed, Hossam et Élise. C'est à cause de vous que tous les jours étaient excitants et pleins d'humour. J'aimerais aussi faire un remerciement spécial à Elham, ma voisine de bureau, avec qui j'ai partagé mes meilleurs moments à l'institut et qui est devenue une très bonne amie. Je n'oublie pas non plus les autres amis de l'institut : Gabrielle, Kim, Michelle, Isabelle, Claudie, Jean-Christophe, Rafael, Francis, David, Marc, Marc-André, Benoit, Laure et plusieurs autres personnes. Plusieurs d'entre vous aviez participé au moins une fois aux séances de yoga à l'heure du midi, ce qui a été une activité assez réussite. Merci à tous et à toutes de m'avoir donné pleins de bons souvenirs pendant mes 2 années de maîtrise.

Finalement, je dois un grand remerciement à mes parents et à ma famille de m'avoir supporté tout au long de ce parcours et de m'avoir encouragé jusqu'à la fin.



## RESUME

Le rôle du récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR) dans le contrôle du système immunitaire demeure encore mal compris. Récemment, il a été démontré que l'activation d'AhR par certains ligands pouvait influencer la différenciation des cellules T. Notre but est d'étudier les effets de différents ligands d'AhR sur la différenciation des cellules Treg et Th17, ainsi que de déterminer les proportions des sous-types de cellules T chez des populations à risques d'expositions aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et d'autres ligands d'AhR, soient les pompiers et les grands brûlés. Suite à la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> en Treg ou Th17 en présence de différents ligands, nous avons observé une augmentation des Treg et Th17 en présence de benzo-a-pyrène, une diminution des Treg par VAF347, bilirubine et kynurénine, puis une diminution des Th17 par l'indirubine. L'analyse par cytométrie en flux des sous-populations de cellules T chez les pompiers démontre une augmentation des Th17 comparé au groupe contrôle, mais aussi une corrélation positive et négative entre les années d'expérience des pompiers et les cellules Th1 et Th2 respectivement. La présence de ligands d'AhR a aussi été détectée dans les sérums de grands brûlés par le test XRE-luciférase. Cette étude permet de démontrer qu'une exposition à des HAPs ou d'autres ligands d'AhR pourrait potentiellement se retrouver dans l'organisme et affecter la réponse immunitaire par la modulation de la différenciation des cellules T.

Mots clés : récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR), cellules T, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), pompiers, grands brûlés

## ABSTRACT

The role of aryl hydrocarbon receptor (AhR) in controlling the immune system by the modulation of T cell differentiation remains largely unclear. Recently, it was shown that AhR activation by certain ligands could influence T cell differentiation. We aimed to study the effects of different AhR ligands on Treg and Th17 cell differentiation, as well as to determine the proportions of T cell subsets in populations most at risk of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and other AhR ligands, such as firefighters and burn victims. After CD4<sup>+</sup> T cells were differentiated into Treg or Th17 cells in the presence of different ligands, we observed an increase in Treg and Th17 cells in the presence of benzo-a-pyrene, a reduction of Treg cells by VAF347, bilirubin and kynurenin, and a reduction in Th17 cells by indirubin. Flow cytometry analyses of T cell subsets in firefighters revealed an increase of Th17 cells compared to control groupe, but also a positive and negative correlation between firefighters' years of experience and the Th1 and Th2 cells respectively. The presence of AhR ligands was also detected in burn victims' serums by the XRE-luciferase assay. This study allows us to demonstrate that an exposure to PAHs or other AhR ligands could potentially be found in our organism and affect the immune response by modulating T cell differentiation.

Key words : Aryl hydrocarbon receptor (AhR), T cells, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), firefighters, burn



# TABLE DES MATIÈRES

|  |             |
|--|-------------|
| <b>REMERCIEMENTS</b> .....                                   | <b>iii</b>  |
| <b>RESUME &amp; ABSTRACT</b> .....                           | <b>v</b>    |
| <b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....                          | <b>ix</b>   |
| <b>LISTE DES FIGURES</b> .....                               | <b>xi</b>   |
| <b>INTRODUCTIONS DES HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS</b> .....       | <b>xiii</b> |
| <b>INTRODUCTION</b> .....                                    | <b>1</b>    |
| <b>1 RÉPONSE IMMUNITAIRE</b> .....                           | <b>1</b>    |
| 1.1 Les lymphocytes T.....                                   | 1           |
| 1.2 Différenciation des cellules T CD4+ .....                | 5           |
| 1.3 Régulation entre les cellules T .....                    | 8           |
| 1.4 Plasticité développementale .....                        | 9           |
| 1.5 Les cellules Th17 et Treg .....                          | 11          |
| <b>2 LE RÉCEPTEUR DES HYDROCARBURES AROMATIQUES</b> .....    | <b>12</b>   |
| 2.1 Structure et voie de signalisation .....                 | 12          |
| 2.2 Fonctions d'AhR .....                                    | 15          |
| 2.3 Immunotoxicité et AhR.....                               | 16          |
| 2.4 Mécanismes d'action.....                                 | 18          |
| 2.5 AhR chez les Treg et les Th17 .....                      | 20          |
| <b>3 LES LIGANDS D'ADR</b> .....                             | <b>21</b>   |
| 3.1 Les ligands exogènes et endogènes .....                  | 21          |
| 3.2 Les ligands chez les pompiers et les grands brûlés ..... | 26          |
| <b>4 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS</b> .....                       | <b>28</b>   |
| <b>ARTICLE SCIENTIFIQUE</b> .....                            | <b>29</b>   |
| Résumé.....  | 29          |
| Abstract.....  | 31          |
| Introduction .....   | 32          |
| Materials and methods .....                                  | 34          |
| Results .....  | 37          |
| Discussion .....   | 48          |
| References.....  | 51          |
| <b>CONCLUSION</b> .....                                      | <b>53</b>   |
| <b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....                                   | <b>56</b>   |



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AhR : récepteur des hydrocarbures aromatiques  
AhRR : répresseur du récepteur des hydrocarbures aromatiques  
ALD : alcool déshydrogénase  
APC : antigen presenting cell, cellule présentatrice d'antigène  
ARNT : translocateur nucléaire d'AhR  
BaP : benzo-a-pyrène  
BATF : basic leucine zipper transcription factor, ATF-like  
bHLH-PAS : hélix-boucle hélix simples Per-ARNT-Sim  
Bili : bilirubine  
CARS : syndrome de réponse anti-inflammatoire compensatoire  
CMH: complexe majeur d'histocompatibilité  
CPA: cellule présentatrice d'antigène  
CYP450: cytochrome P450  
DMBA: 7,12-dimethylbenz(a)anthracene  
DRE: élément de réponse à la dioxine  
EGFR : récepteur des facteurs de croissance de l'épiderme  
FBS : fetal bovine serum, sérum de veau fœtal  
FICZ: 6-formylindolo[3,2-b]carbazole  
Foxp3: forkhead box P3  
GATA-3: protéine de liaison GATA 3  
GST: glutathion s-transférase  
GVH : graft versus host, greffe contre hôte  
HAH : hydrocarbure aromatique halogéné  
HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique; PAH en anglais  
Hsp90: protéine de choc thermique 90  
I3C : indole-3-carbinole  
IFN- $\gamma$ : interféron gamma  
IL: interleukine  
IRF4 : interferon regulatory factor 4, facteur de régulation de l'interféron 4  
Kyn : kynurénine  
LT: lymphocyte T

MODS : syndrome de défaillance multiviscérale  
NES: séquence d'exportation nucléaire  
NF-κB : facteur nucléaire κB  
NK: natural killer  
NLS: séquence de localisation nucléaire  
NQO: quinone oxydoréductase  
PBMC : peripheral blood mononuclear cells, cellules mononucléaires du sang périphérique  
RORγt: récepteur de l'acide rétinoïque γt  
SIRS : syndrome de réponse inflammatoire systémique  
T-bet: facteur de transcription T-box  
TAD : domaine de transactivation  
Tc: T cytotoxique  
TCDD: 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine  
TGFβ: transforming growth factor beta, facteur de croissance transformant beta  
Th: T auxiliaire (helper)  
TNF: tumor necrosis factor, facteur de nécrose tumorale  
Treg: T régulatrice  
UGT : uridine triphosphate glucuronosyl transférase  
VAF347 : (4-(3-chloro-phenyl)-pyrimidin-2-yl)-(4-trifluoromethyl-phenyl)-amine  
XRE: élément de réponse aux xénobiotiques

# LISTE DES FIGURES

## Introduction

**Figure 1.1** : Les cellules du système immunitaire

**Figure 1.2** : Les cytokines impliquées dans la différenciation des sous-types de cellules T et leurs profils d'expression de cytokines

**Figure 1.3** : Différenciation des cellules T et régulation intercellulaire

**Figure 1.4** : Contrôle de la plasticité des cellules T CD4+ par les cytokines présentes dans le micro-environnement

**Figure 2.1** : Domaines protéiques du AhR

**Figure 2.2** : Transduction du signal intracellulaire du AhR activé par un ligand

**Figure 3.1** : Structures cellulaires des ligands d'AhR

**Figure 3.2** : Biotransformation du BaP, détoxification et activation métabolique

## Article scientifique

**Figure 1** : Activation d'AhR par différents ligands avec un test XRE-luciférase

**Figure 2** : Les effets des ligands d'AhR sur la différenciation des cellules Treg et Th17 dans des conditions favorisant la différenciation des Treg et Th17 respectivement, puis dans une condition de non-différenciation

**Figure 3** : Proportion des différents sous-types de cellules T chez un groupe contrôle non fumeurs et chez des pompiers avec moins de 10 ans et plus de 20 ans d'expérience

**Figure 4** : Corrélation entre les proportions des différents sous-types de cellules T et les années d'expérience chez les pompiers

**Figure 5** : Activation d'AhR par les sérums du groupe témoins, des pompiers et des grands brûlés avec le test XRE-luciférase



## INTRODUCTIONS DES HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Notre étude est basée sur la capacité du AhR et de ses ligands à moduler la différenciation des cellules T. Puisque ces cellules jouent un rôle important dans la régulation d'une réponse immunitaire, il est possible que l'exposition à des HAPs puisse avoir un effet sur des maladies inflammatoires chroniques ou aiguës et le système immunitaire en général. Notre hypothèse était que les personnes les plus exposées aux HAPs, soient les pompiers et les grands brûlés, allaient avoir un profil de sous-types de cellules T différent de celui des autres personnes de la population générale. Puisqu'AhR est un récepteur capable de lier une multitude de molécules différentes et d'induire la différenciation des cellules T soit en Th17 ou Treg dépendamment du type de ligand, nous nous sommes attendus à observer une différence dans les cellules Treg et Th17. De plus, puisque les cellules Th22 expriment AhR comme facteur de transcription maître et résident dans l'épiderme, qui est un site en contact avec le milieu externe, nous nous sommes aussi attendus à voir une différence dans cette population de cellules. Notre objectif était de déterminer différents ligands potentiels d'AhR, exogènes et endogènes, capable d'avoir un effet sur la différenciation des cellules Treg et Th17. Nous voulions aussi analyser la proportion des différentes populations de cellules T chez les pompiers et chez des personnes d'un groupe témoin pour faire une comparaison. Finalement, nous voulions déterminer la présence de ligands d'AhR dans le sérum des grands brûlés et des pompiers. Notre but était de vérifier s'il y avait une différence dans le profil de population de cellules T chez des populations à risques. Ensuite, nous voulions confirmer si ces différences étaient causées par la présence d'HAPs ou d'autres substances exogènes capables activer AhR dans le sérum ou par des ligands endogènes produits suite à une brûlure.

# INTRODUCTION

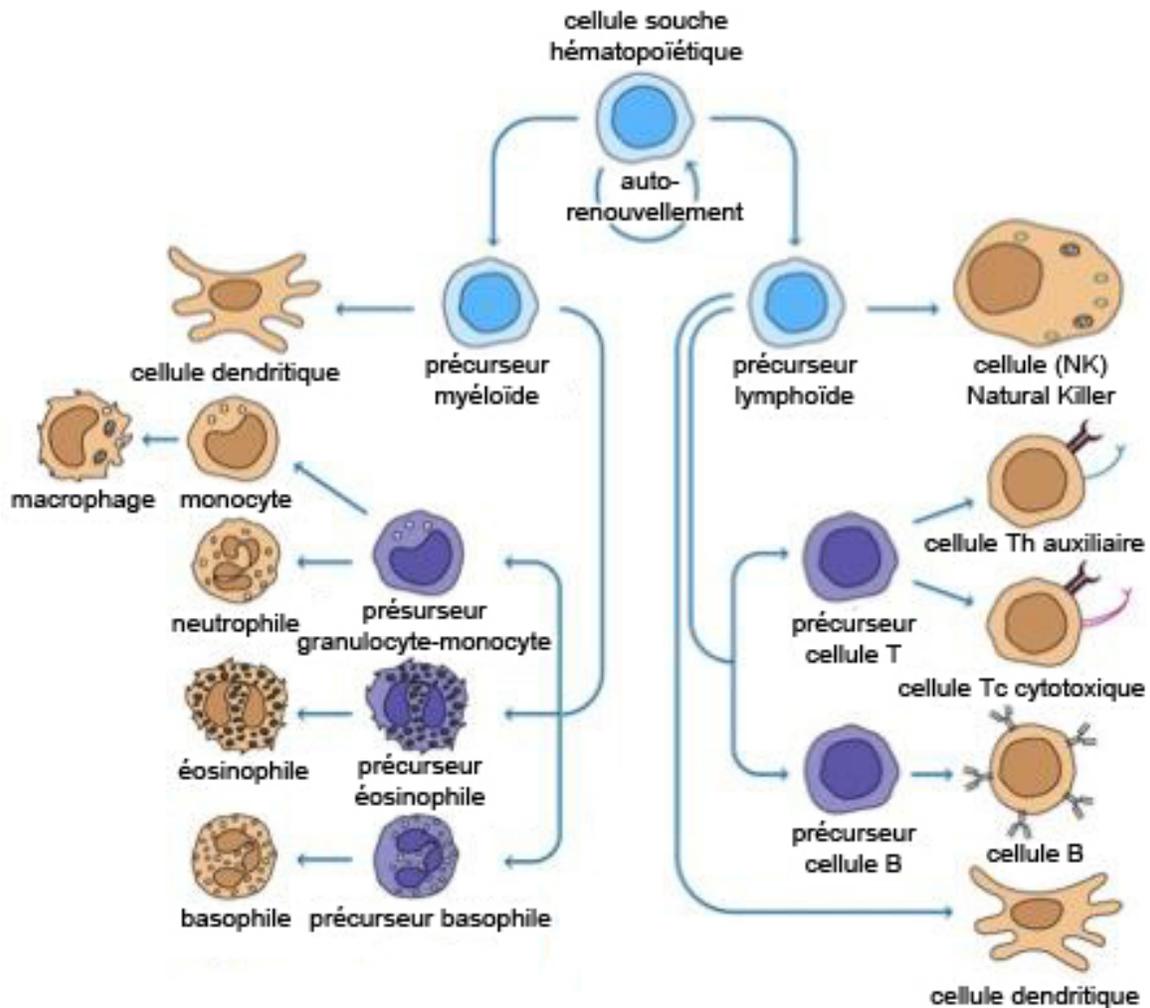
## 1 RÉPONSE IMMUNITAIRE

Le mécanisme de défense principal de l'organisme contre les agents pathogènes est le système immunitaire, composé d'une multitude de cellules que l'on retrouve principalement dans le sang. Ces cellules ont des capacités de communication et de coopération sophistiquées et forment un réseau très complexe afin d'assurer la mise en place d'une réponse immunitaire appropriée (Kindt et al. , 2007). Le système immunitaire peut être divisé en deux types, soient l'immunité innée et l'immunité adaptative (**Fig. 1.1**). L'immunité innée forme la première ligne de défense de l'organisme. Ce type de défense est très efficace pour empêcher la plupart des infections dès le début et permet d'éliminer le pathogène dans les quelques heures qui suivent l'infection. L'immunité innée est composée de cellules qui dérivent des précurseurs myéloïdes, regroupant des cellules polymorphonucléaires, dont les neutrophiles, éosinophiles, basophiles, mastocytes, cellules dendritiques et les monocytes. Malgré les multitudes niveaux de protection du système inné, certains pathogènes peuvent échapper aux défenses innées, ce qui nous amène à la deuxième ligne de défense, l'immunité adaptative. Celle-ci est dépendante de l'immunité innée et débute quelques jours après celle-ci. Ce second système est capable de faire la distinction des différences subtiles entre les molécules étrangères et est capable d'établir une réponse mémoire suite à la rencontre d'un nouveau pathogène (Kindt et al., 2007). L'immunité adaptative est capable de combattre une infection grâce à des réponses spécifiques adaptées à chaque organisme pathogène (Kindt et al., 2007). Parmi les cellules de l'immunité adaptatives, on retrouve les cellules dendritiques, les cellules T et les cellules B (Kindt et al., 2007).

### 1.1 Les lymphocytes T

Pour qu'une réponse immunitaire soit efficace et fonctionnelle, une bonne communication entre les cellules de l'immunité innée et adaptative doit exister. Une des cellules possédant un rôle important dans cette communication est la cellule T. Ces

cellules forment une sous-population de la lignée lymphoïde, provenant des cellules souches hématopoïétiques (Kindt et al., 2007). Elles sont formées dans la moelle osseuse, mais passent obligatoirement à travers un organe lymphoïde primaire, le thymus, pour leur phase de maturation afin de devenir des lymphocytes T (LT) naïves possédant un récepteur de surface (RCT) capable de reconnaître des antigènes spécifiques (Kindt et al., 2007). Une fois en circulation en périphérie, ces cellules T naïves peuvent être activées suite à une interaction entre le RCT et un antigène présenté sur une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et devenir des cellules T effectrices (Kindt et al., 2007). Suite à leur activation, elles peuvent se différencier en deux types de cellules T qui possèdent des fonctions différentes : les cellules T  $CD4^+$  auxiliaires (Th) et les cellules T  $CD8^+$  cytotoxiques (Tc). Ces deux sous-populations de cellules T peuvent être distinguées les unes des autres par la présence à leur surface de glycoprotéines membranaires CD4 ou CD8 (Kindt et al., 2007). Les cellules Tc ont comme rôle de surveiller les cellules de l'organisme afin de reconnaître et détruire les cellules de l'hôte altérées, donc qui présentent des antigènes étrangers, telles que les cellules infectées par des virus, des cellules tumorales ou des cellules pouvant provenir d'une greffe d'un tissu étranger (Kindt et al., 2007). D'autre part, les cellules Th agissent plutôt comme des cellules auxiliaires capables d'aider l'activation des cellules B, des cellules Tc, des macrophages et de nombreux autres types de cellules participants à la réponse immunitaire en sécrétant des cytokines (Kindt et al., 2007).



**Figure 1.1** Les cellules du système immunitaire. Les différents sous-types de cellules immunitaires sont classés dans deux lignées distinctes, soit myéloïde et lymphoïde, qui proviennent d'une cellule souche hématopoïétique (Kindt *et al.*, 2007).

Les cellules Th  $CD4^+$  peuvent se différencier d'avantage en d'autres sous-types spécifiques : les cellules Th1, Th2, Th17, Th22 et les cellules T régulatrices (Treg). Chacun de ces sous-types ont des rôles bien déterminés dans la régulation de la réponse immunitaire dictés entre autre par un profil de cytokines distincts. En effet, la composition des cytokines sécrétées par les différentes cellules Th activées correspond à des types différents de réponse immunitaire (Kindt *et al.*, 2007). Par exemple, les Th1 produisent majoritairement de l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), mais aussi de l'interleukine-2 (IL-2) et des molécules faisant partie de la famille des facteurs de nécrose tumoraux (TNF), comme le TNF- $\alpha$  et la lymphotoxine  $\alpha$  (Luckheeram *et al.*, 2012). Les Th1 jouent un rôle dans l'immunité cellulaire pro-inflammatoire pour favoriser l'élimination des pathogènes

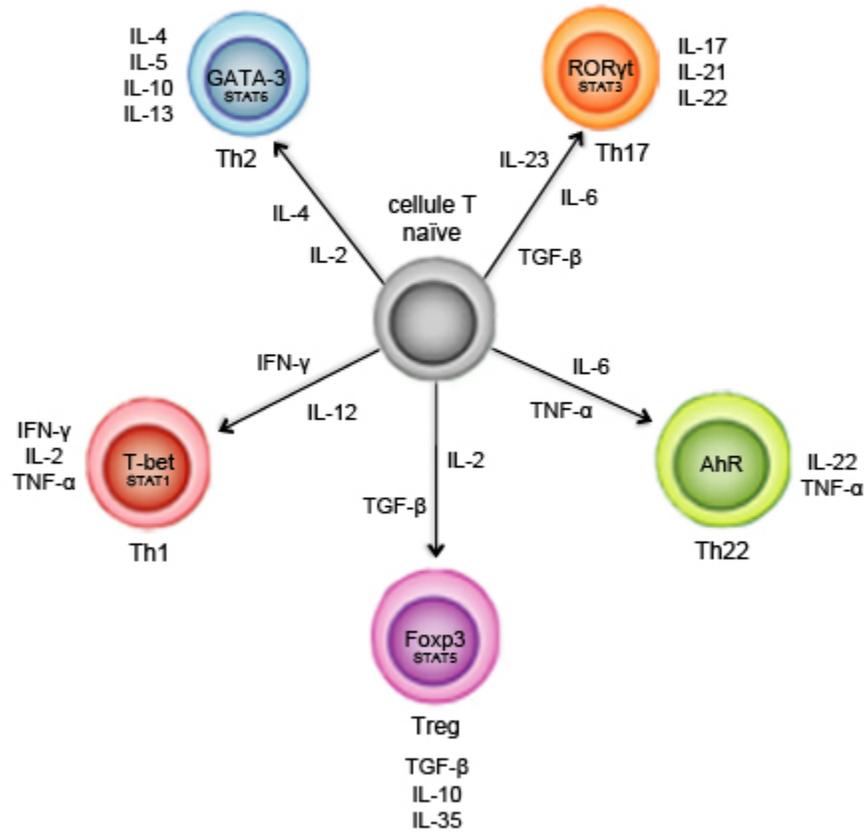
intracellulaires et sont aussi associées avec l'autoimmunité organe-spécifique (Luckheeram et al., 2012). Les Th2 sécrètent principalement de l'IL-4, mais aussi de l'IL-5, l'IL-13 et l'IL-10 (Luckheeram et al., 2012). Ces cellules vont plutôt promouvoir une réponse immune contre les parasites extracellulaires, comme les helminthes, et jouent un rôle important dans l'induction et la persistance de l'asthme ainsi que d'autres maladies allergiques (Luckheeram et al., 2012). Les Th2 vont promouvoir une réponse immune qui va être majoritairement non-inflammatoire et vont inhiber cette dernière par la production d'IL-10. Ensuite, les Th17 sont responsables de monter une réponse immune contre les bactéries et les champignons extracellulaires, de promouvoir une réponse pro-inflammatoire, mais elles ont aussi été démontré pour avoir une implication importante dans la génération des maladies autoimmunes et d'inflammation chronique (Luckheeram et al., 2012; Rendon et al., 2012). Les cytokines effectrices clés qu'elles sécrètent sont l'IL-17A et l'IL-17F, mais aussi l'IL-21 et l'IL-22 (Luckheeram et al., 2012; Sallusto et al., 2012). Similairement aux Th17, les Th22 sécrètent de l'IL-22 et aussi du TNF- $\alpha$ , mais pas d'IL-17, d'IFN- $\gamma$  ni d'IL-4 (Eyerich et al., 2009). Les Th22 sont des cellules avec un profil pro-inflammatoire et sont impliquées dans le remodelage des tissus, l'angiogenèse et la fibrose (Eyerich et al., 2009). Ces cellules résident principalement au niveau de la peau dans l'épiderme, où elles aident à monter une défense contre des pathogènes envahissant chez les kératinocytes en induisant l'immunité adaptative et innée via ces cellules (Eyerich et al., 2009). Finalement, les Treg sont caractérisées par la sécrétion d'IL-10, du facteur de croissance de transformation (TGF- $\beta$ ) et de l'IL-35. Elles jouent un rôle important dans le maintien de la tolérance immunitaire contre les antigènes du soi et étrangers, et dans l'atténuation des allergies (Luckheeram et al., 2012). Suite à l'élimination des pathogènes, les Treg vont réguler négativement la réponse immune pour permettre un retour à l'homéostasie, protégeant ainsi l'hôte contre des pathologies immunitaires (Luckheeram et al., 2012; Yamaguchi et al., 2011). En effet, les Treg ont un caractère anti-inflammatoire avec la capacité de réprimer les autres cellules T effectrices (Yamaguchi et al., 2011).

## 1.2 Différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup>

Les différents sous-types de cellules T CD4<sup>+</sup> se différencient à partir d'une cellule T CD4<sup>+</sup> naïve suite à son activation par une stimulation antigénique par une cellule présentatrice d'antigène (CPA), comme une cellule dendritique (Kindt et al., 2007). La différenciation en une lignée spécifique va dépendre de son microenvironnement, donc des cytokines du milieu dans lequel la cellule T se retrouve (Luckheeram et al., 2012). Ainsi, des combinaisons différentes de cytokines dans le microenvironnement de la cellule T lors de son activation vont engendrer sa différenciation en des sous-types spécifiques (**Fig. 1.2**). La source initiale de cytokines provient des CPAs, ainsi que d'autres cellules de l'immunité innée (Luckheeram et al., 2012). Les cytokines produites par les cellules différenciées peuvent subséquemment créer un boucle de rétroaction positive pour renforcer leur différenciation (Luckheeram et al., 2012). La présence de ces cytokines va initier une cascade de signalisation qui va aboutir à l'expression des gènes lignée-spécifiques. Un joueur important dans cette signalisation est le facteur de transcription maître, qui est lignée-dépendent et qui est le régulateur principal dans la différenciation de la cellule (Luckheeram et al., 2012).

Pour les Th1, ce sont l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  qui vont initier la cascade de signalisation et activer plusieurs facteurs de transcription comme STAT1 (Signal Transducers and Activators of Transcription), mais c'est surtout le facteur de transcription T-box (T-bet), le régulateur maître, qui va réguler un ensemble de gènes pour promouvoir la différenciation de ce phénotype particulier, dont la production significative d'IFN- $\gamma$  (Luckheeram et al., 2012). Une augmentation de la production d'IFN- $\gamma$  crée une rétroaction positive pour amplifier l'expression de T-bet et augmenter l'expression du récepteur à l'IL-12 (IL-12R), assurant ainsi l'expansion des cellules Th1 différenciées (Luckheeram et al., 2012). Dans le cas des Th2, ce sont l'IL-4 et l'IL-2 qui sont critiques pour la différenciation de ces cellules. Les facteurs de transcription importants dans la différenciation de cette lignée incluent STAT6 activé par l'IL-4, qui va ensuite augmenter l'expression de la protéine de liaison GATA (GATA-3), le facteur de transcription maître (Luckheeram et al., 2012). GATA-3 a été suggéré d'être impliqué dans l'augmentation de la production des cytokines Th2 (Luckheeram et al., 2012). *In vivo*, GATA-3 est indispensable pour la réponse Th2, mais d'autres études ont démontré que GATA-3 tout seul ne pouvait pas réguler tous les gènes Th2-spécifiques et devait collaborer avec

STAT6 (Horiuchi et al., 2011; Luckheeram et al., 2012). Pour les Th17, c'est l'IL-6, le TGF- $\beta$  et l'IL-23 qui sont les cytokines majeures impliquées dans leur différenciation avec le récepteur orphelin gamma-T relié au récepteur de l'acide rétinoïque (ROR $\gamma$ t) comme facteur de transcription maître et STAT3, un autre facteur de transcription important (Ganjalikhani et al., 2011; Luckheeram et al., 2012). La différenciation des Th17 peut être divisée en trois étapes : la différenciation, l'auto-amplification et la stabilisation (Luckheeram et al., 2012; Rendon et al., 2012). L'étape de la différenciation est médiée par TGF- $\beta$  et IL-6, activant ainsi ROR $\gamma$ t, qui va collaborer avec plusieurs autres facteurs de transcriptions pour permettre à la cellule de réguler des gènes lignées-spécifiques, dont la production d'IL-17 (Luckheeram et al., 2012). En effet, il a été démontré que certains facteurs de transcription comme STAT3, IRF4 (facteur de régulation de l'interféron 4) et BATF (basic leucine zipper transcription factor, ATF-like) sont impliqués dans l'expression de ROR $\gamma$ t, mais jouent aussi un rôle dans la collaboration avec ce dernier pour l'expression d'IL-17 et possiblement d'autres protéines de la lignée Th17 (Littman et al., 2010). La deuxième étape d'auto-amplification consiste à monter une réponse immune robuste. Contrairement aux Th1 et Th2, où leurs cytokines principales respectives, IFN- $\gamma$  et IL-4, agissent comme amplificateurs dans un boucle de rétroaction positive, la cytokine principale des Th17, l'IL-17, n'a pas de rôle dans son amplification (Luckheeram et al., 2012). C'est plutôt IL-21, produite en quantité significative par Th17, qui va agir en collaboration avec TGF- $\beta$  pour amplifier la différenciation de Th17. L'étape finale nécessite IL-23 pour induire l'expansion et la stabilité de la population de Th17, mais aussi pour permettre à ces cellules d'acquérir leur potentiel inflammatoire, donc la sécrétion des cytokines proinflammatoires (Luckheeram et al., 2012; McAleer et al., 2011; Rendon et al., 2012). Les cascades de signalisation d'IL-6 et d'IL-21 induisent l'expression du récepteur d'IL-23 (IL-23R) à la surface des Th17, permettant à celles-ci de lier l'IL-23 sécrété par les CPAs (Luckheeram et al., 2012; Rendon et al., 2012).



**Figure 1.2** Les combinaisons de cytokines dans le microenvironnement d'une cellule T CD4<sup>+</sup> naïve pour la différenciation en cellules Th1, Th2, Th17, Th22 et Treg. Chaque sous-type de cellule T est représenté par son facteur de transcription maître, ainsi que d'autres facteurs de transcription importants pour la lignée, et les cytokines qu'il sécrète.

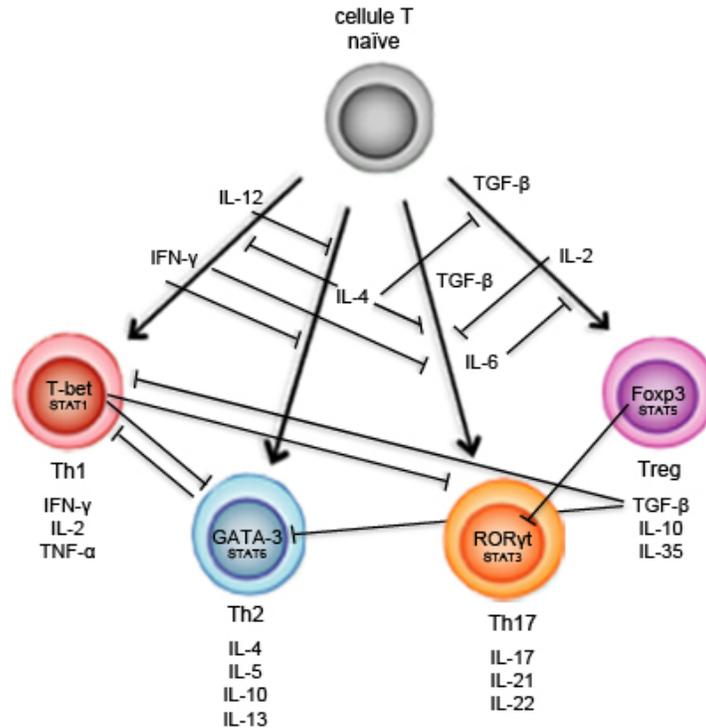
Par la suite, des cellules T naïves peuvent aussi se différencier en Th22 en présence de TNF- $\alpha$  et d'IL-6, avec le récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR) comme facteur de transcription maître, qui va être abordé plus loin (Eyerich et al., 2009; Ramirez et al., 2010). L'activation d'AhR est nécessaire pour l'expression d'IL-22, même chez les Th17, car en son absence, il n'y a pas de production d'IL-22 (Veldhoen et al., 2008). Les mécanismes moléculaires restent à être élucidés. Finalement, pour les cellules Treg, TGF- $\beta$  est la cytokine critique pour initier la différenciation de cette lignée en permettant l'expression du facteur de transcription maître, le «forkhead box P3» (Foxp3), ainsi que STAT5, mais elle a aussi besoin de l'IL-2 (Chen et al., 2003; Luckheeram et al., 2012). En effet, Foxp3 est induit en aval de la voie de signalisation de TGF- $\beta$  (Luckheeram et al., 2012). Il est le régulateur clé dans le programme de différenciation des Treg. De plus, les Treg possèdent une grande quantité de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 de haute affinité (CD25), donc nécessitent aussi de l'IL-2 pour leur survie et expansion

(Littman et al., 2010). STAT5 est un autre facteur de transcription qui se retrouve en aval de la voie de signalisation d'IL-2 et qui est capable de promouvoir la différenciation des Treg en aidant l'expression de Foxp3 (Laurence et al., 2007; Luckheeram et al., 2012).

### 1.3 Régulation entre les cellules T

Étant donné que chaque sous-type de cellule T CD4<sup>+</sup> possède des fonctions spécifiques et nécessite un programme de différenciation différent des autres, des mécanismes d'inter-régulation entre ces cellules sont nécessaires afin d'assurer le développement d'une réponse immunitaire adéquate. En effet, les protéines impliquées dans la différenciation d'une lignée spécifique ont souvent des fonctions inhibitrices sur les autres protéines impliquées dans la différenciation d'une autre lignée. Par exemple, le facteur de transcription T-bet chez les Th1 réprime le développement des lignées cellulaires opposantes, comme Th2 et Th17 (Luckheeram et al., 2012). T-bet réprime le développement de Th2 en inhibant l'expression du gène de l'IL-4, qui est crucial pour son développement, et inhibe aussi les fonctions du facteur de transcription maître des Th2, GATA-3 (Djuretic et al., 2007; Luckheeram et al., 2012). Lors de la différenciation en Th1, la lignée des Th17 est inhibée par l'interaction de T-bet avec un autre facteur de transcription, Runx1, pour bloquer la transactivation du gène *Rorc*, qui code pour le facteur de transcription maître ROR $\gamma$ t (Lazarevic et al., 2011). D'autre part, GATA-3 a aussi été soupçonné d'avoir un rôle dans la répression du développement des Th1 lors de la différenciation des Th2 en inhibant l'activité de T-bet (Zhu et al., 2006). La cytokine des Th1, l'IGF- $\gamma$ , joue un rôle dans l'inhibition de la différenciation des Th2, puis inhibe aussi le développement des Th17 à travers la signalisation via le facteur de transcription STAT1 (Hirota et al., 2010). L'IL-4, une cytokine des Th2, agit d'une manière similaire pour inhiber les Th1, les Th17 et les Treg (Hirota et al., 2010). Il existe aussi une régulation entre les Th17 et Treg. Celles-ci partagent l'exigence du TGF- $\beta$  dans leur différenciation, qui est suffisant pour induire Foxp3 et ROR $\gamma$ t, les facteurs de transcription des lignées Treg et Th17 respectivement (Hirota et al., 2010). Dans ce cas, Foxp3 interagit avec ROR $\gamma$ t pour bloquer la transcription du gène *IL17*, favorisant ainsi la voie de différenciation en Treg (Hirota et al., 2010). Par contre, la présence d'IL-6, d'IL-21 et d'IL-23 prévient l'induction de Foxp3 par TGF- $\beta$ , initiant donc la différenciation en Th17 (Bettelli et al., 2006; Hirota et al., 2010). TGF- $\beta$  est aussi capable d'inhiber

l'expression des facteurs de transcription T-bet et GATA-3 (Muranski et al., 2013). De plus, IL-23, impliqué dans la polarisation en Th17, inhibe l'expression de T-bet (Bi et al., 2012) (**Fig. 1.3**).

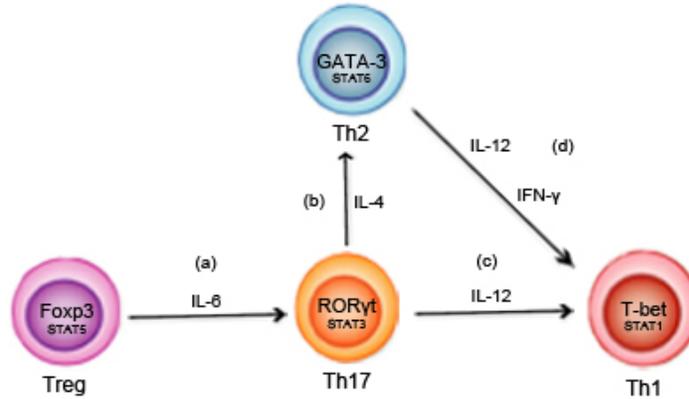


**Figure 1.3** La différenciation d'une cellule T procède dans une voie distincte déterminée par les cytokines qui sont produites par les CPA lors de l'activation de la cellule T naïve, ce qui permet d'exprimer les facteurs de transcription spécifiques pour contrôler la différenciation. Les autres voies sont contre-régulées par ces mêmes cytokines et les facteurs de transcription exprimés qui dictent une voie spécifique. Cela assure le développement de réponses immunes optimisées à la situation (modifié de Kerkvliet, 2009)

## 1.4 Plasticité développementale

Pendant des années, la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves en des lignées spécifiques a été considérée comme un évènement irréversible. Malgré l'inter-régulation stricte entre ces cellules, elles ne sont pas complètement mutuellement exclusives, mais possèdent un potentiel important de plasticité qui leur permette de changer de profil au cours d'une réponse immunitaire. Ces conversions vont principalement dépendre des cytokines du microenvironnement dans lequel les cellules se retrouvent (Zhou et al., 2009). Cette plasticité a surtout été étudiée chez les Th17 et les Treg, où un équilibre

entre les cellules effectrices et les cellules régulatrices nécessite une plasticité dans la régulation transcriptionnelle (**Fig. 1.4**) (Zhou et al., 2009). Comme nous l'avons mentionné précédemment, Th17 et Treg requièrent TGF- $\beta$  pour leur différenciation. L'exposition au TGF- $\beta$  résulte en une augmentation transcriptionnelle de Foxp3, mais aussi de ROR $\gamma$ t, rendant la cellule pluripotente pour les deux lignées (Zhou et al., 2009). Les cellules T CD4<sup>+</sup> qui co-expriment Foxp3 et ROR $\gamma$ t vont pouvoir se différencier soit en Th17 ou soit en Treg dépendamment du milieu de cytokine global. De plus, la concentration de TGF- $\beta$  dans le milieu est un facteur important dans la différenciation. En présence de cytokines proinflammatoires et à de faibles concentrations de TGF- $\beta$ , ce dernier inhibe la voie de signalisation de l'IL-2, une cytokine inhibitrice des Th17, et contribue à la différenciation de cette lignée (Muranski et al., 2013; Weaver et al., 2009; Yang et al., 2008; Zhou et al., 2009). Par contre, en absence de cytokines proinflammatoires et en présence d'une forte concentration de TGF- $\beta$ , la différenciation des Treg est favorisée en inhibant le programme de différenciation des Th17 (Muranski et al., 2013; Weaver et al., 2009; Yang et al., 2008; Zhou et al., 2009). Les Treg ont aussi la capacité de se convertir en des Th17 lorsqu'elles se retrouvent dans un milieu contenant des cytokines proinflammatoires (Littman et al., 2010; Zhou et al., 2009). Cependant, la culture des Treg dans une condition de polarisation en Th1 ne permet pas la conversion des Treg en Th1 (Zhou et al., 2009). D'autres études ont aussi démontré que les Th17 étaient capables de se convertir en Th1 et Th2, mais pas vice versa (McAleer et al., 2011). En présence d'IL-12 ou d'IL-4, les cellules Th17 se convertissent en Th1 ou Th2 respectivement (Lexberg et al., 2008). En effet, les Th17 possèdent un grand potentiel de plasticité, car elles maintiennent le potentiel d'exprimer T-bet, Foxp3 et GATA-3 (McAleer et al., 2011). Des cellules IL-17<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, donc possédant des phénotypes de Th17 et Th1, sont facilement détectables dans des conditions d'homéostasie ou inflammatoires (McAleer et al., 2011; Zhou et al., 2009). Les lignées Th1 et Th2 ont été longtemps considérées comme étant stables, mais des études récentes ont démontrées que les Th2 peuvent être induites par IFN- $\gamma$  et IL-12 pour exprimer T-bet et IFN- $\gamma$  suite à une infection avec un virus, acquérant ainsi un phénotype mixte de Th1 et Th2 (Hegazy et al., 2010; Littman et al., 2010). Ainsi, la plasticité de ces cellules, qui leur permet de reprogrammer les fonctions des cellules T, est critique pour conférer une réponse immunitaire protectrice et de pouvoir changer de réponse rapidement face à un nouveau pathogène.



**Figure 1.4** Le milieu de cytokines contrôle la plasticité des cellules T CD4<sup>+</sup>. (a) Les Treg peuvent se convertir en Th17 en présence de cytokines pro-inflammatoire, comme l'IL-6. Les Th17 ont la capacité de se convertir en Th2 et Th1 en présence d'IL-4 (b) et d'IL-12 (c) respectivement. (d) Les Th2 peuvent aussi se convertir en Th1 en présence d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$ .

## 1.5 Les cellules Th17 et Treg

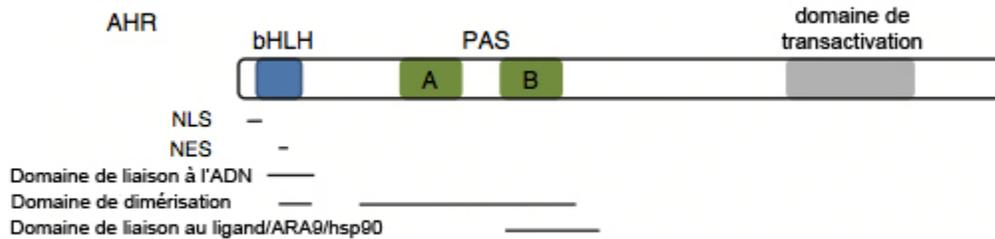
Depuis la découverte des Th17 et des Treg, plusieurs groupes de chercheurs ont démontré des liens étroits entre ces deux types cellulaires. Les Th17 sont présentement fortement étudiées dans le domaine des maladies autoimmunes et inflammatoires, suite à la découverte de leur rôle crucial comme cellule effectrice dans l'induction de l'inflammation (Fletcher et al., 2009; Miossec et al., 2012; Weaver et al., 2009). Ces cellules résident majoritairement dans les barrières qui viennent en contact avec la surface externe, surtout dans les muqueuses de l'intestin, où elles protègent l'hôte contre les microorganismes envahissant l'épithélium, mais aussi au niveau des poumons et de la peau (Miossec et al., 2012; Weaver et al., 2009). Les Treg se retrouvent aussi aux mêmes endroits, où elles ont comme fonctions de restreindre des réponses excessives des cellules T effectrices qui peuvent endommager les tissus de l'hôte, puis de maintenir l'homéostasie et la tolérance au soi (Corsini et al., 2011; Weaver et al., 2009). Le fait que ces cellules se retrouvent préférentiellement au niveau des mêmes tissus avec des fonctions opposées, mais réciproques, suggère l'importance de l'équilibre entre ces deux populations pour maintenir l'homéostasie immunitaire. Cette interdépendance entre les Th17 et Treg a incité plusieurs chercheurs à faire des études sur ces cellules, ce qui a mené à la découverte du rôle important du récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR). Étant donné qu'AhR est un récepteur qui a été fortement étudié en toxicologie, son expression chez les Th17 et Treg a attiré la

recherche dans le domaine de l'immunotoxicologie. En effet, certains chercheurs ont démontré que l'activation d'AhR par différents ligands pouvait jouer un rôle dans la différenciation des Th17 et Treg, suscitant ainsi un lien entre l'immunité et l'environnement (Funatake et al., 2005; Gandhi et al., 2010; Quintana et al., 2008; Veldhoen et al., 2008).

## 2 LE RÉCEPTEUR DES HYDROCARBURES AROMATIQUES

### 2.1 Structure et voie de signalisation

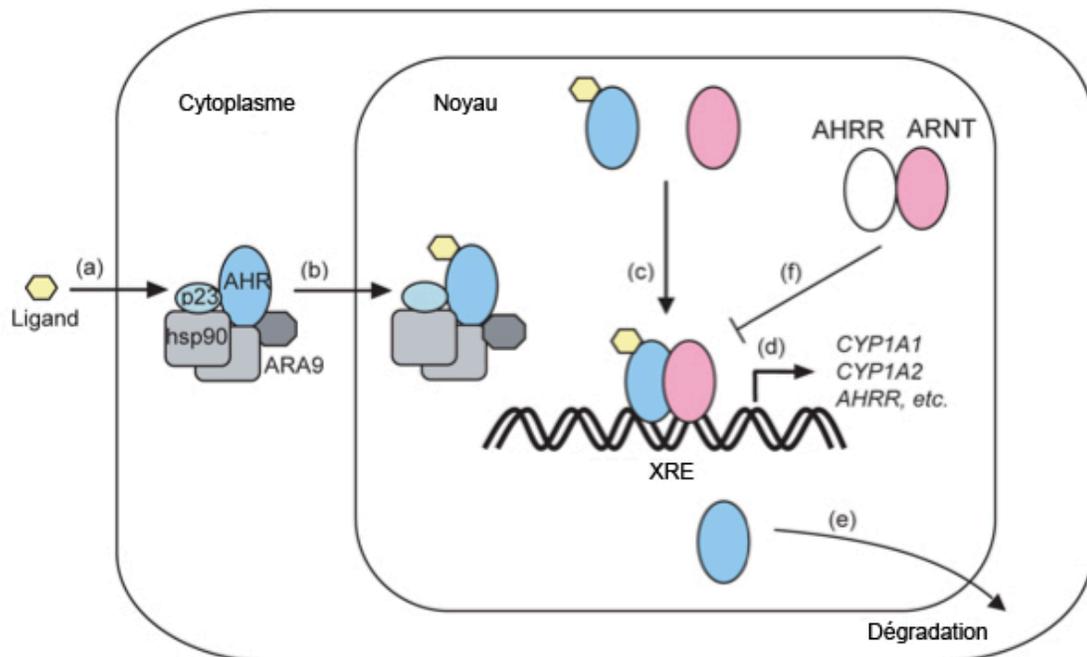
L'AhR est une protéine avec une ancienne origine qui a été hautement conservée à travers l'évolution (Esser et al., 2009; Stevens et al., 2009). Des analyses phylogénétiques ont révélé que des orthologues fonctionnels du gène *Ahr* sont présents chez les mammifères, les amphibiens, les reptiles et les oiseaux (Stevens et al., 2009). AhR est un facteur de transcription ligand-dépendent appartenant à la famille des récepteurs hélix-boucle hélix simples Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS), qui joue des rôles dans le développement, dans la neurogénèse, la vascularisation, les rythmes circadiens, le métabolisme dans les réponses de stress et possède un rôle comme senseur biologique à une variété de molécules à l'intérieur et à l'extérieur de l'organisme (Esser et al., 2009; Klaassen, 2007; Stevens et al., 2009). Il possède un domaine N-terminal hélice-boucle-hélice simple (bHLH) avec des séquences d'exportation (NES) et de localisation nucléaire (NLS), qui joue un rôle dans la liaison à l'ADN, supporte la dimérisation d'AhR avec le translocateur nucléaire d'AhR (ARNT) dans le noyau et est impliqué dans les interactions protéine-protéine (Klaassen, 2007; Stevens et al., 2009) (**Fig. 2.1**). Le domaine C-terminal d'AhR est variable et est responsable pour les différences de poids moléculaires à l'intérieur et entre les espèces (Stevens et al., 2009). Cette région largement non-structurée contient un domaine d'activité transcriptionnelle, permettant l'activation de la transcription suite à la liaison à l'ADN (Stevens et al., 2009). AhR possède aussi un domaine central PAS, contenant deux séquences répétées (appelées A et B), qui est responsable de la médiation de l'hétérodimérisation avec ARNT, de la liaison à un ligand et des interactions avec des protéines chaperonnes (Stevens et al., 2009).



**Figure 2.1** Les domaines protéiques retrouvés dans l'AhR. La séquence de localisation nucléaire (NLS) et la séquence d'exportation nucléaire (NES) se retrouvent à l'intérieur de la région hélice-boucle-hélice simple (bHLH). Le bHLH joue aussi un rôle important dans la liaison à l'ADN. Les domaines caractéristiques des membres de la famille Per-ARNT-Sim (PAS) médient l'hétérodimérisation et la liaison aux chaperonnes. Le C-terminal est variable, mais contient le domaine de transactivation (TAD), responsable pour l'activation de la transcription après la liaison à l'ADN (modifié de Stevens *et al.*, 2009).

En absence de ligand, AhR se retrouve principalement dans le cytoplasme dans un complexe avec des chaperonnes, dont la protéine de choc thermique 90 (Hsp90), le co-chaperonne p23, l'associé d'AhR 9 (ARA9 ou AIP) et autres (Stevens *et al.*, 2009). En plus d'aider à maintenir AhR dans le cytosol dans une conformation qui lui permet de lier un ligand, Hsp90 prévient la translocation nucléaire furtive d'AhR (Stevens *et al.*, 2009). La co-chaperonne p23 stabilise l'interaction Hsp90-AhR, alors que l'ARA9 augmente la signalisation d'AhR en augmentant le nombre d'AhR correctement replié dans le cytoplasme (Stevens *et al.*, 2009). Une fois lié à un ligand, AhR subit des changements conformationnels menant à l'exposition de la séquence de localisation nucléaire, ce qui permet au complexe AhR-chaperonnes de transloquer au noyau où AhR se dissocie du complexe pour aller lier son partenaire de dimérisation ARNT, qui est structurellement similaire à AhR (Esser *et al.*, 2009; Klaassen, 2007; Stevens *et al.*, 2009). Cet appariement hétérodimérique d'AhR-ARNT produit un facteur de transcription compétent qui se lie à des séquences consensus dans les promoteurs, 5'-TNGCGTG-3', référées comme des éléments de réponse à la dioxine (DRE) ou des éléments de réponse aux xénobiotiques (XRE), qui sont retrouvés dans les régions promotrices de plusieurs gènes importants (Esser *et al.*, 2009; Klaassen, 2007; Marshall *et al.*, 2008; Stevens *et al.*, 2009) (**Fig. 2.2**). La liste des gènes qui peuvent être régulés par AhR continue de s'allonger, mais les gènes cibles les plus connus sont les enzymes de métabolisation des xénobiotiques, comme la famille des cytochrome P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1), le glutathion transférase (GST), l'UDP glucuronosyl transférase (UGT), l'alcool déshydrogénase (ALD) et la quinone oxydoréductase (NQO) (Klaassen, 2007;

Stevens et al., 2009). La diminution de la signalisation d'AhR peut se faire de deux manières. La première voie est l'ubiquitine/protéasome, où AhR est exporté du noyau pour être dégradé (Stevens et al., 2009). AhR peut aussi être atténué par un répresseur (AhRR) structurellement similaire, qui rentre en compétition avec AhR pour lier ARNT, ce qui résulte en un complexe transcriptionnellement inactif (Klaassen, 2007; Stevens et al., 2009). AhRR est un gène régulé par XRE et son expression augmente rapidement suite à l'activation d'AhR (Stevens et al., 2009). Il contient un domaine de répression transcriptionnelle puissant et ne requiert pas de ligand pour se dimériser avec ARNT, permettant de fournir une boucle de rétroaction négative pour contrôler la transcription des gènes médiée par AhR (Klaassen, 2007; Stevens et al., 2009).



**Figure 2.2** Transduction du signal d'AhR activé par un ligand. (a) Un ligand diffuse à l'intérieur de la cellule et lie le complexe cytosolique d'AhR. (b) Le complexe récepteur lié au ligand transloque dans le noyau. (c) AhR dimérise avec ARNT et vont lier des XREs ensemble, (d) menant à l'activation transcriptionnelle des gènes cibles. (e) AhR est exporté vers le cytosol où il est dégradé. (f) Le dimère d'AhRR et ARNT régule négativement l'activité transcriptionnelle d'AhR (modifié de Nguyen et al., 2007)

## 2.2 Fonctions d'AhR

Pendant plus de trente ans, AhR a été intensément étudié en toxicologie comme un récepteur des contaminants environnementaux et comme un médiateur de la toxicité chimique due à son rôle dans la régulation de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans la métabolisation des xénobiotiques et sa capacité à répondre à une panoplie de contaminants environnementaux, certaines drogues et des composés endogènes (Klaassen, 2007; Stevens et al., 2009). En effet, AhR est ubiquitaire et est exprimé chez une multitude de types cellulaires à des niveaux différents (Esser et al., 2009). Il faut noter que les tissus qui viennent en contact avec le milieu extérieur, comme les poumons, les intestins, la peau, les reins et le foie, expriment des plus hauts niveaux d'AhR comparé aux autres organes comme les muscles et le cerveau, qui possèdent une faible expression (Esser et al., 2013; McAleer et al., 2011). Ainsi, AhR joue un rôle important dans la surveillance des contaminants environnementaux dans l'organisme et dans la détoxification. En plus d'être un facteur de transcription, AhR a aussi été démontré comme étant un E3 ubiquitine ligase ligand-dépendent, ayant donc une double fonction dans le contrôle intracellulaire des niveaux de protéines, étant capable d'induire l'expression des gènes et de réguler sélectivement la dégradation des protéines (Kimura et al., 2008). Plusieurs recherches ont pu démontrer qu'AhR possédait des fonctions physiologiques importantes qui touchent le développement embryonnaire, la régulation de la différenciation des cellules, le cycle cellulaire, la neurogénèse, la vascularisation, le rythme circadien, puis les systèmes immunitaire, hépatique, reproductif, cardiovasculaire et hématopoïétique (Casado et al., 2010; Esser et al., 2009; McAleer et al., 2011; Van Voorhis et al., 2013). Par exemple, dans la peau, un tissu qui exprime fortement AhR, ce dernier est impliqué dans plusieurs aspects physiologiques, dont la détoxification, l'homéostasie cellulaire, la pigmentation et l'immunité de la peau (Esser et al., 2013). La découverte de ces fonctions a été possible grâce à l'utilisation des souris AhR-nulles ( $AhR^{-/-}$ ). Ces souris sont caractérisées par un taux de croissance plus lent, un taux de fécondité réduit, plusieurs anomalies développementales, surtout au niveau du foie et de la peau, une hypertrophie cardiaque et l'hypertension (Esser et al., 2009; Esser, 2009; N. Kerkvliet, 2002; Stevens et al., 2009; Van Voorhis et al., 2013). Il existe aussi d'autres modèles de souris recombinantes qui peuvent porter des allèles du gène *Ahr* possédant des affinités différentes. Par exemple, une souris portant l'allèle *d* d'AhR ( $AhR^d$ ) aurait une affinité

réduite de 10-100 fois pour ses ligands due à des mutations dans son site de liaison aux ligands, mais AhR aurait une forte affinité pour ses ligands avec l'allèle *b* du gène (AhR<sup>b</sup>), qui serait due à un changement dans sa structure secondaire (Esser et al., 2009; Kerkvliet, 2002; Quintana et al., 2008). Le polymorphisme de l'allèle *Ahr* permet donc d'avoir des souris avec des AhR de différentes affinités. Par exemple, les souris B6 ont généralement un AhR<sup>b</sup> de haute affinité, alors que les 129 et DBA/2 ont plus souvent l'allèle de faible affinité AhR<sup>d</sup> (Esser et al., 2009; Marshall et al., 2010). La possibilité d'avoir des souris AhR<sup>-/-</sup>, ainsi que des allèles de fortes (AhR<sup>b</sup>) et faibles (AhR<sup>d</sup>) affinités, a donné l'opportunité d'étudier le rôle physiologique d'AhR et son rôle dans le développement normal.

### 2.3 Immunotoxicité et AhR

AhR semble avoir un rôle multidimensionnel dans le système immunitaire. En effet, chez les souris AhR-nulles, on retrouve un élargissement de la rate avec un nombre altéré de lymphocytes, une diminution de l'expression d'IL-22, des anomalies dans le système immunitaire inné, une diminution du nombre de cellules lymphoïdes innées dans les intestins, une capacité réduite pour maintenir le compartiment des cellules souches hématopoïétiques, puis une hématopoïèse extramédullaire périnatale du foie (Esser et al., 2009; Stevens et al., 2009; Van Voorhis et al., 2013). De plus, la majorité des cellules immunitaires, dont les lymphocytes T et B, les cellules de la lignée myéloïde comme les cellules dendritiques, les macrophages et les granulocytes, puis les cellules NK, expriment AhR, ce qui appuie le rôle important d'AhR dans ce système (Kerkvliet, 2009). Les études sur le rôle d'AhR dans l'immunotoxicité ont été réalisées grâce au 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD), une substance chimique immunosuppressive, qui avait démontré que sa toxicité dépendait de la liaison et de l'activation du AhR (Kerkvliet, 2009). Due à sa stabilité et sa grande affinité pour AhR, TCDD est le prototype utilisé dans la majorité des études en immunotoxicologie (Veldhoen et al., 2010). Il a été démontré chez les humains que TCDD est capable d'induire une suppression de l'immunité cellulaire, une diminution des cellules T périphériques et une atrophie thymique (De Heer et al., 1995; Vos et al., 1997). L'immunotoxicité chez les souris est encore plus marquée, avec une suppression de l'immunité cellulaire et humorale, une réduction de la transcription des chaînes

d'immunoglobulines, une diminution de la résistance de l'hôte à une variété d'agents infectieux, une réduction du nombre de cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse et une perturbation des rythmes circadiens des précurseurs hématopoïétiques (Klaassen, 2007; Vos et al., 1997). Cependant, malgré plusieurs années d'études, les mécanismes de l'immunosuppression ne sont pas complètement compris. L'expression d'AhR sur une multitude de cellules immunitaires pourrait en sorte expliquer la raison pour laquelle le TCDD exerce un effet immunosuppressif aussi efficace. Les dissimilitudes entre les effets observés du TCDD chez les humains et les souris sont basées sur des différences dans l'immunité adaptative et innée entre les humains et les souris, comme les proportions des sous-types lymphocytaires, certains composants dans la voies de signalisation des cellules B et T, les cytokines et leurs récepteurs, l'expression des molécules de co-simulation et l'expression des chimiokines et leurs récepteurs (Mestas et al., 2004). De plus, on peut observer une différence dans l'affinité de liaison d'AhR entre les souris et les humains. En effet, l'affinité d'AhR pour ses ligands est généralement 10 fois plus élevée chez les souris (AhR<sup>b</sup>) que chez les humains (Flaveny et al., 2009). Les effets de toxicité du TCDD chez les humains sont aussi moins prononcés que chez les souris (Kociba et al., 1982). Les dissimilitudes observées au niveau de l'effet de l'activation d'AhR par un même ligand chez plusieurs espèces pourraient être expliquées par les différences dans la région C-terminale d'AhR (Flaveny et al., 2009). Les disparités de séquences d'acides aminés dans le domaine de transactivation C-terminal d'AhR favorisent le recrutement différentiel des co-activateurs. En conséquence, AhR peut recruter différents sous-types de co-activateurs, ce qui pourrait expliquer le fonctionnement différentiel suite à la liaison au ligand (Flaveny et al., 2009). Cependant, la structure et la fonction globale du système immunitaire des souris et des humains demeurent assez similaires (Mestas et al., 2004). Il est difficile de déterminer l'importance et les impacts des différences immunologiques entre les humains et les souris, mais il est nécessaire de prendre en considération que les réponses observées chez les souris ne vont pas se reproduire de la même manière chez les humains. Toutefois, les souris demeurent des modèles *in vivo* essentiels pour l'immunologie des humains (Mestas et al., 2004).

## 2.4 Mécanismes d'action

Notre compréhension des mécanismes moléculaires du fonctionnement d'AhR demeure encore incomplète. En effet, il existe plusieurs études qui étudient les mécanismes d'action potentiels de cette protéine et qui présentent des hypothèses. Tout d'abord, AhR possède le mécanisme d'action d'un facteur de transcription car des études ont pu démontrer qu'AhR était capable de réguler plusieurs gènes en se liant au niveau des promoteurs sur l'ADN. En effet, plusieurs gènes possèdent des séquences XRE, sur lesquelles AhR se lie, au niveau de leurs promoteurs, dont les gènes des enzymes métabolisant des xénobiotiques et plusieurs gènes reliés à l'inflammation et la réponse immunitaire (Esser et al., 2009; Esser et al., 2013; Nguyen et al., 2013). La régulation de la transcription par AhR va moduler l'expression des protéines qui, à leur tour, vont avoir des effets sur la cellule. Par exemple, lors de la différenciation de Treg, AhR induit l'expression d'un autre facteur de transcription, Smad1, qui va aller stabiliser et favoriser l'expression de Foxp3, permettant ainsi le développement de cette lignée (Gandhi et al., 2010). Ensuite, il a aussi été observé qu'AhR interagit avec différentes protéines pour réguler l'expression d'un gène dans des contextes cellulaires différents et dans une manière ligand-dépendante. En effet, plusieurs interactions d'AhR avec d'autres protéines ne sont seulement déclenchées que par des ligands spécifiques d'AhR, ce qui suggère que certains partenaires transcriptionnels d'AhR sont recrutés d'une manière ligand-dépendante (Quintana, 2013). Par exemple, AhR a été démontré comme ayant un rôle dans la différenciation des Th17. En effet, il est capable d'interagir avec STAT1 et STAT5, des facteurs de transcription impliqués respectivement dans la voie de signalisation de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-2 causant une régulation négative du développement des Th17 limitant ainsi leur activation (Kimura et al., 2008). AhR forme aussi un complexe avec le facteur de transcription c-Maf pour faire une activation coopérative au niveau des promoteurs d'*il10* et d'*il21* chez les humains et les souris (Apetoh et al., 2010; Quintana, 2013). Un autre exemple serait l'interaction d'AhR avec les sous-unités RelA et RelB du facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), un facteur de transcription impliqué dans plusieurs réponses physiologiques et pathologiques, les réponses inflammatoires et l'apoptose (Kim et al., 2000; Tian et al., 2002; Vogel et al., 2009). Dans certains cas, AhR peut activer NF- $\kappa$ B, alors que dans d'autres cas, il mène à sa suppression (Tian, 2009). Il est possible que différents ligands induisent la formation de complexes protéiques d'AhR qui diffèrent dans leur composition, pouvant mener à la

reconnaissance des séquences d'ADN non canoniques, donc pas des XRE. De plus, AhR peut aussi réguler l'expression des gènes cibles au niveau épigénétique. En effet, en présence du TCDD, un ligand d'AhR, celui-ci a la capacité de contrôler le statut épigénétique du locus *foxp3* pour le rendre plus accessible à plus de facteurs de transcription par une déméthylation partielle du promoteur, ce qui favorise la différenciation des Treg, et augmente la méthylation du promoteur de *il17*, ce qui inhibe le développement des Th17 (Singh et al., 2011). Étant donné qu'AhR demeure dans un complexe protéique dans le cytoplasme lorsqu'il n'est pas activé par un ligand, un de ses mécanismes d'action pourrait être de libérer une protéine de ce complexe pour qu'elle puisse devenir fonctionnelle. Par exemple, suite à l'activation d'AhR par certains ligands, il a été démontré qu'il y avait une activation intracellulaire de la voie de signalisation du récepteur des facteurs de croissance de l'épiderme (EGFR) (Haarmann-Stemmann et al., 2009). En effet, une des protéines chaperonnes du complexe cytoplasmique d'AhR est c-SRC, une tyrosine kinase qui possède plusieurs cibles cellulaires une fois libérée du complexe (Quintana, 2013). c-SRC soluble est capable de transloquer à la membrane cellulaire où elle peut interagir avec EGFR et phosphoryler deux résidus tyrosine spécifiques, ce qui résulte en la dimérisation du récepteur et l'initiation de la signalisation (Haarmann-Stemmann et al., 2009). Finalement, une autre étude a démontré que des antagonistes d'AhR bloquent l'activation d'AhR par certains ligands (Smith et al., 2011). Ceci suggère que différents ligands pourraient causer des changements conformationnels dans la poche de liaison, ce qui éviterait la compétition par d'autres sous-types de ligands. Cependant, étant donné qu'AhR n'a pas encore été cristallisé, nos connaissances sur sa structure tridimensionnelle restent limitées, puis les études sur les mécanismes d'action et la façon qu'AhR interagit avec ses ligands restent un défi (Esser et al., 2009).

## 2.5 AhR chez les Treg et les Th17

Comme décrit plus haut, AhR a été démontré ayant un rôle important dans le système immunitaire. Chez les lymphocytes T, ce n'est pas tous les sous-types qui expriment AhR. En effet, les cellules T naïves, les Th1 et les Th2 ne l'expriment pas, alors que les Treg et les Th17 l'expriment (Esser et al., 2009). Par contre, même si l'expression d'AhR a été détectée chez les Treg, les niveaux d'expression sont très faibles comparés aux Th17 (Esser et al., 2009). Plusieurs chercheurs ont démontrés que l'activation d'AhR chez ces cellules était capable de moduler leur différenciation. Cette modulation a été démontrée avec le TCDD et le FICZ, un métabolite issue de la photo-oxydation du tryptophane par des rayons UV (Veldhoen et al., 2008).

Funatake et Marshall (2005) ont démontré que le TCDD réprimait la réponse cytotoxique en réduisant le nombre de précurseurs CD8<sup>+</sup> activés au début d'une réponse et que cette répression était aussi dépendante de la présence des cellules CD4<sup>+</sup> AhR<sup>+/+</sup> (Funatake et al., 2005). En effet, il a été démontré que l'exposition au TCDD chez la souris activait AhR et induisait la génération des cellules T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, ayant des caractéristiques fonctionnelles des Treg (Funatake et al., 2005). Ces résultats démontrent que la suppression CD4-dépendante pourrait être expliquée par le développement des Treg, qui aurait comme rôle de restreindre la réponse immune (Funatake et al., 2005). D'autre part, il a été démontré que l'activation *in vivo* ou *in vitro* d'AhR chez la souris par TCDD menait à une expansion de la population de Treg fonctionnelles, suite à une conversion des cellules CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> en des CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> avec une activité suppressive des Treg (Quintana et al., 2008). Suite à une exposition au TCDD on retrouve chez les souris une augmentation de la concentration en TGF-β1 et une plus faible concentration en d'IFN-γ et d'IL-17, ce qui reflète la diminution de la fréquence de cellules T CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup>, donc des Th17 et Th1 respectivement (Quintana et al., 2008). Ainsi, l'activation d'AhR par un traitement au TCDD induit la génération des Treg, par un mécanisme TGF-β-dépendant, et une suppression des cellules T effectrices, comme Th17 et Th1 (Quintana et al., 2008). Cependant, l'utilisation du FICZ, qui est considéré comme un ligand endogène, donne un résultat opposé. L'activation *in vitro* d'AhR par FICZ n'induit pas de conversion des cellules CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> en des CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>, mais interfère avec la différenciation des Treg induites par TGF-β (Quintana et al., 2008). Par contre, en condition de polarisation

des Th17, donc en présence de TGF- $\beta$  et d'IL-6, l'activation d'AhR par FICZ favorisait la différenciation des Th17 *in vitro* et *in vivo* (Quintana et al., 2008). L'effet du FICZ sur les Th17 a été démontré par un autre groupe de chercheurs, où ils ont démontré que l'activation *in vitro* d'AhR par FICZ lors du développement des Th17 augmentait significativement la proportion de ces cellules ainsi que la production de ses cytokines effectrices, IL-17A, IL-17F et IL-22 (Veldhoen et al., 2008). Ainsi, ces études ont démontré qu'AhR pouvait avoir des rôles opposés dans la différenciation des Th17 et Treg dépendamment du ligand par lequel le récepteur a été activé. Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels AhR régule la différenciation de ces deux types cellulaires restent encore à être élucidés, mais il a été démontré que les voies de signalisation d'AhR et de TGF- $\beta$  se régulent l'une et l'autre d'une manière cellule-spécifique (Quintana et al., 2008). Donc, il serait possible qu'AhR et TGF- $\beta$  fassent partis d'une même voie de signalisation qui mène un précurseur commun vers le programme de différenciation des Treg ou des Th17 (Quintana et al., 2008).

### **3 LES LIGANDS D'AhR**

#### **3.1 Les ligands exogènes et endogènes**

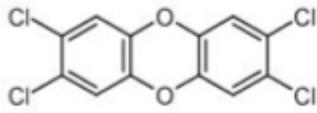
Le ligand le plus utilisé pour étudier AhR est le TCDD, qui est généralement reconnu comme un contaminant environnemental toxique, persistant et ubiquitaire (Marshall et al., 2010). Grâce à ces caractéristiques, TCDD est très persistant et est même résistant aux enzymes de métabolisation dans l'organisme (Marshall et al., 2010). En fait, la plupart des ligands qui lie AhR sont des molécules hydrophobes de deux classes structurelles : les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), comme le 7,12-dimethylbenz(a)anthracène (DMBA) et le benzo-a-pyrène (BaP), et les hydrocarbures aromatiques halogénés (HAH), comme le TCDD (Klaassen, 2007; Nguyen et al., 2007). Les substances avec des groupements halogènes aux positions latéraux des anneaux coplanaires sont souvent des agonistes d'AhR (Nguyen et al., 2007). En effet, les ligands halogénés (ex : Cl) avec au moins 4 positions non-ortho sont capables de lier AhR et d'induire des effets similaires au TCDD (Nguyen et al., 2007). La différence majeure entre ces composés est la dose nécessaire pour induire l'effet, ce qui reflète l'affinité de liaison et leur résistance au métabolisme (Nguyen et al., 2007). Les HAPs

ont différents effets immunotoxiques qui dérivent de leur susceptibilité d'être métabolisés et de générer des métabolites toxiques, comme des diol-époxydes réactifs à l'ADN (Nguyen et al., 2007). Il a été estimé que les ligands d'AhR doivent avoir une longueur de 12.0-14.0 Å, moins de 12 Å en largeur et moins de 5 Å en profondeur (Nguyen et al., 2007). De plus, les ligands peuvent être séparés en trois catégories principales : exogènes/synthétiques, exogènes/naturels et endogènes (Denison et al., 2003; Esser et al., 2013). La première catégorie regroupe le TCDD, les HAP et les HAH, qui sont généralement reconnus pour avoir une forte affinité pour le récepteur, surtout le TCDD (Denison et al., 2003). La deuxième catégorie regroupe des ligands qui proviennent principalement de notre diète. En effet, plusieurs études ont pu démontrer que ces ligands peuvent directement activer et/ou inhiber la voie de signalisation d'AhR (Denison et al., 2003). Par contre, la plupart des ligands qui proviennent de la diète sont des ligands de faibles affinités (Denison et al., 2003). Les flavonoïdes, incluant les flavones, flavanoles, flavanones et isoflavones représentent le plus grand groupe de ligands naturels dans la diète, mais la majorité sont des antagonistes (Denison et al., 2003). Un autre groupe de ligands exogènes naturels est les indoles, dont indole-3-carbinole (I3C) qui est un composé retrouvé dans les plantes et qui est en compétition pour lier AhR et induit des gènes AhR-dépendants (Denison et al., 2003). Il existe aussi les indigoïdes, comme indigo et indirubine, qui peuvent être catégorisés comme un ligand exogène/naturel ou endogènes (Nguyen et al., 2007). On peut les retrouver dans les plantes, mais ils ont aussi été isolés de l'urine humaine et bovine (Nguyen et al., 2007). En fait, ils sont des ligands puissants et spécifiques pour AhR, puisqu'ils rentrent en compétition avec TCDD (Denison et al., 2003; Nguyen et al., 2007). La dernière catégorie regroupe les ligands endogènes, donc qui sont formés dans l'organisme. D'après les études sur les souris AhR<sup>-/-</sup> et la découverte du rôle important d'AhR dans le développement physiologique, les anomalies observées chez ces souris ont été présumées d'être causées par la perte de l'activation d'AhR par un ligand endogène, malgré le fait que l'identité de la molécule chimique responsable reste à être déterminée (Denison et al., 2003). Par contre, une variété de composés endogènes a été identifiée qui était capable de lier AhR et d'activer l'expression des gènes AhR-dépendants, comme les métabolites qui dérivent du tryptophane (Denison et al., 2003). La plupart de ces ligands d'AhR sont formés à partir du tryptophane suite à divers processus biologiques et physicochimiques, comme l'indirubine, le FICZ et la kynurénine, mais il y a aussi d'autres candidats de ligands endogènes comme la bilirubine par exemple

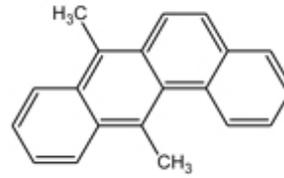
(Denison et al., 2003; Nguyen et al., 2007). Ainsi, la similarité que l'on peut remarquer parmi les ligands d'AhR connus est l'aromaticité de ces molécules. En effet, tous ces composés possèdent une ou plusieurs cycles aromatiques (**Fig. 3.1**). Avec cette connaissance, des ligands synthétiques de forte affinité ont même été fabriqués, comme le VAF347 (Esser et al., 2009).

Les ligands les plus connus et les plus étudiés sont les hydrocarbures aromatiques, qui sont principalement formés par des combustions incomplètes de matières organiques, dont la fumée des cigarettes, la combustion des déchets municipaux et industriels, la combustion des combustibles fossiles et des feux de forêts (Guillon et al., 2013; Klaassen, 2007; Simoneit, 2002; Uno et al., 2009). Par contre, ils peuvent aussi être formés comme sous-produits lors des processus de fabrication d'un autre composé, comme le TCDD qui peut provenir des processus utilisant des phénols chlorés ou lors de la combustion des matériaux chlorés (Klaassen, 2007). Les principales voies d'exposition aux hydrocarbures aromatiques sont l'ingestion et l'inhalation de la nourriture et de l'air contaminés respectivement, ainsi que par contact dermique (Pinel-Marie et al., 2011). En effet, due à l'hydrophobicité des hydrocarbures aromatiques, ceux-ci peuvent traverser la couche cornée de la peau et l'épiderme par diffusion passive (Klaassen, 2007). Ces composés peuvent activer l'AhR, ce qui induit généralement l'expression des gènes de métabolisation, comme les enzymes du cytochrome P450 (Uno et al., 2009). Cependant, certains ligands sont plus résistants à la métabolisation que d'autres, comme les HAHs, ce qui leur permet d'avoir une stimulation prolongée d'AhR. En effet, les groupements halogènes de ces composés vont souvent empêcher ceux-ci d'être métabolisés ou biotransformés (Veldhoen et al., 2010). D'autre part, les HAPs sont rapidement métabolisés par des enzymes qui ont été induites par l'activation d'AhR. Par exemple, la liaison du BaP au AhR mène à l'expression d'un groupe de gènes, dont les enzymes de phase I, comme CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, et les enzymes de phase II, comme le glutathion S-transférase (GST) et l'UDP glucuronosyltransférase (UGT), qui vont produire des métabolites qui peuvent être toxiques à l'organisme et induire des effets nocifs (Uno et al., 2009) (**Fig. 3.2**). Ainsi, certains ligands vont être plus stables que d'autres dans l'organisme et vont pouvoir activer AhR pour un temps prolongé, donnant à ce ligand le potentiel de causer des effets à longue durée.

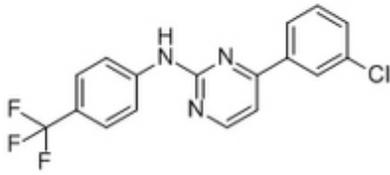
A)



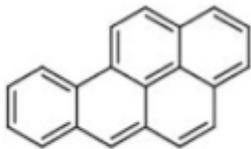
2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine



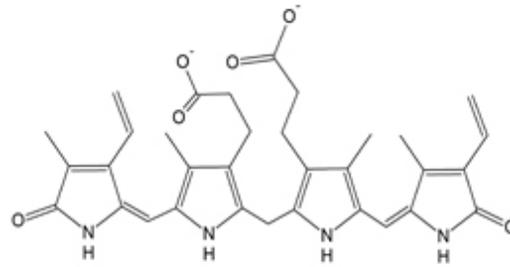
7,12-dimethyl(a)benzantracène



VAF347



benzo(a)pyrène



bilirubine

B)

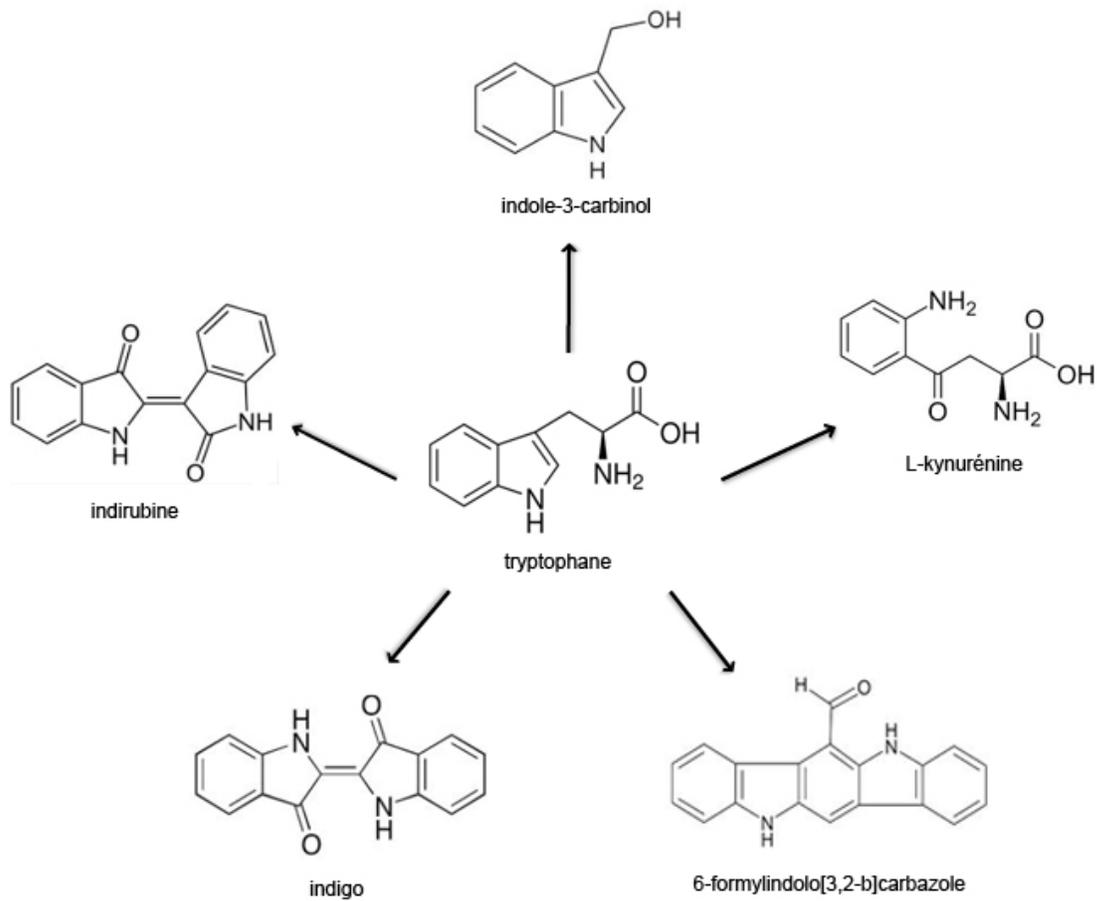
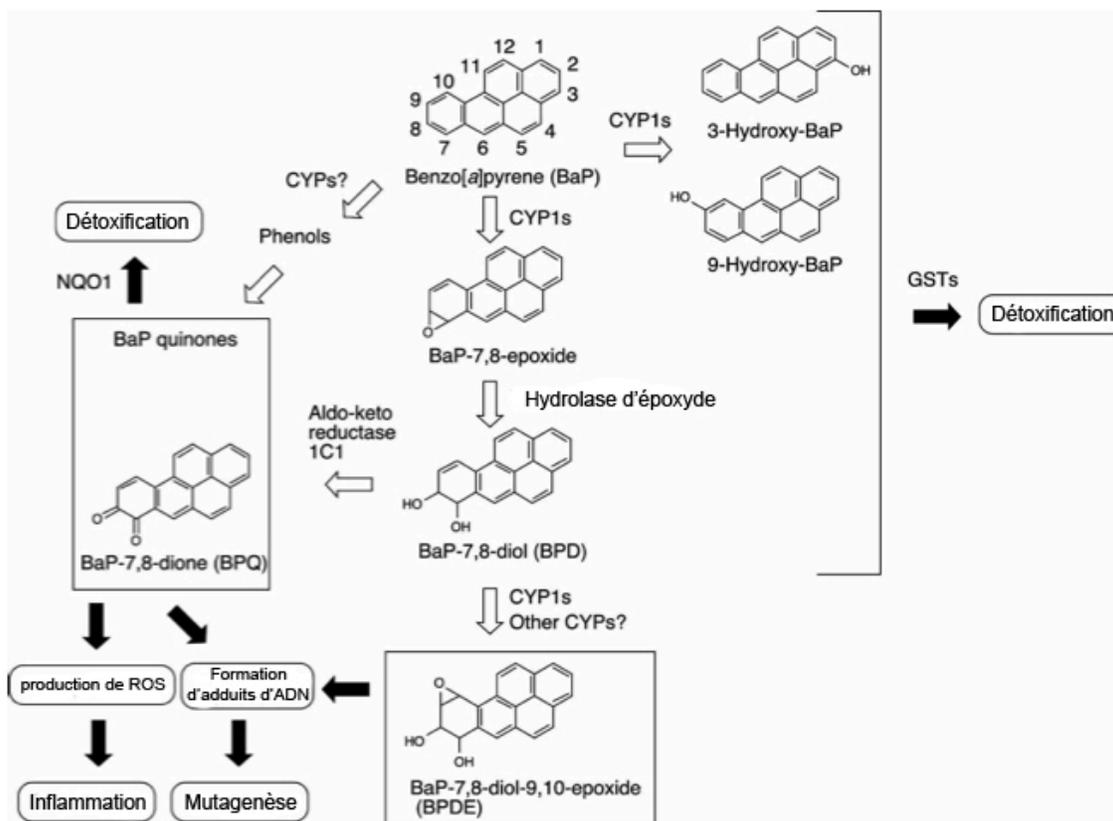


Figure 3.1 Structures moléculaires de certains ligands d'AhR. A) ligands exogènes, endogènes et synthétiques d'AhR. B) Le tryptophane peut être converti par une variété de mécanismes en des ligands d'AhR. (modifié de Nguyen *et al.*, 2007; Denison *et al.*, 2003)



**Figure 3.2** Détoxification et activation métabolique du BaP. BaP est métabolisé par des enzymes de la famille des cytochromes P450, l'hydrolase d'époxyde, le keto-réductase 1C1, NQO1 et des enzymes de la phase II, comme les GSTs. Les métabolites, comme les quinones du BaP, peuvent être génotoxiques par la formation d'adduits d'ADN, ou peuvent induire la production de ROS dans les cellules (modifié de Uno *et al.*, 2009)

### 3.2 Les ligands chez les pompiers et les grands brûlés

Étant donné que les HAPs sont produits en grande quantité lors des combustions incomplètes de matières organiques, on peut donc les retrouver dans la fumée lors des feux. De plus, les personnes les plus exposées à la fumée d'une combustion sont les pompiers. En effet, une étude a déjà démontré que, même avec leurs ensembles de protection complets, les pompiers avaient des niveaux significativement élevés de HAPs dans l'organisme et ils ont suggéré que les HAPs étaient inhalées ou absorbés à travers la peau au niveau du cou, où le niveau de protection dermique était le plus faible (Fent *et al.*, 2014). Un autre groupe avait aussi trouvé des résultats similaires en mesurant des biomarqueurs des HAPs et du benzène dans l'urine des pompiers avec leurs ensembles de protection complet. En mesurant l'excrétion du 1-hydroxypyrene dans l'urine, ils ont

constaté une plus grande augmentation de ce métabolite entre 4 à 8 heures suite à une période d'exposition (Caux et al., 2002). De plus, les pompiers sont aussi exposés à des retardateurs de flamme dans les produits de combustions. En effets, les retardateurs de flamme bromés sont ajoutés dans plusieurs matériaux, surtout les plastiques, mais les risques biologiques ou toxicologiques associés sont peu connus. Par contre, une étude a démontré que ces retardateurs de flammes bromés sont capable de lier et d'activer AhR (Brown et al., 2004). En sachant que les pompiers sont exposés aux HAPs et aux retardateurs de flammes, et que ces composés se retrouvent dans leurs systèmes, il serait possible d'observer une activation d'AhR et des effets subséquents. Puisqu'AhR joue un rôle important au niveau du système immunitaire et que plusieurs groupes ont démontré qu'AhR pouvait moduler la différenciation des différents types de cellules T d'une manière ligand-dépendante, il serait possible que les pompiers aient des proportions différentes de sous-types de cellules T ou une dérégulation générale des cellules du système immunitaire.

Un autre groupe de personnes qui sont exposées aux HAPs sont les grands brûlés, qui, contrairement aux pompiers, sont exposés d'une manière aigue. En effet, il a été démontré chez ces patients que leurs profils de cellules T et les cytokines qu'elles sécrètent sont altérés. Une blessure thermique est souvent caractérisée par des changements globaux dans la réponse immunitaire systémique. Les réponses immunes observées suite à une brûlure suivent souvent un paradigme divisé en deux phases : une phase inflammatoire lors des premiers 7 à 10 jours, suivi d'une phase anti-inflammatoire qui peut durer jusqu'à deux semaines ou plus (Mannick et al., 2001; O'sullivan et al., 1997). Plusieurs études avaient déjà observé un changement de profils de cellules Th1 à Th2 (Alexander et al., 2002; Duan et al., 2008; Pileri et al., 2008). En effet, les études qui ont été faites pour mesurer les concentrations de cytokines dans les sérums des grands brûlés ont démontré une forte production de cytokines proinflammatoires, comme IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-18, IL-6, IL-8 et IL-12, dès les premiers jours après la brûlure (Orman et al., 2011; Pileri et al., 2008; Yamada et al., 1996; Yeh et al., 1999; Yeh et al., 1997). Des cytokines anti-inflammatoires de type Th2 ont aussi été détectées, comme IL-4, IL-10 et IL-13 (Orman et al., 2011; Pileri et al., 2008). De plus, une brûlure cause un des plus grands stress sur le corps humain, menant à des changements pathophysiologiques qui peuvent avoir plusieurs conséquences au niveau systémique. Les états d'hyperactivation et d'hypercatabolisme observés suite à une

brûlure peuvent causer une altération dans la synthèse de protéines et dans la prolifération cellulaire, pouvant mener à un dysfonctionnement immunitaire et causer d'autres conséquences (Mannick et al., 2001; Schwacha, 2009). Les grands brûlés peuvent avoir une dérégulation métabolique, où on pourrait donc observer une synthèse protéique aberrante. Il serait possible que des ligands d'AhR soient produits lors de l'état d'hypercatabolisme, comme la bilirubine qui proviendrait de l'hémolyse (Nguyen et al., 2007). En effet, lors d'une brûlure sévère, les patients présentent des hémolyses intravasculaires, ce qui augmente le taux sérique de bilirubine suite au catabolisme du hème de l'hémoglobine (Kaplan et al., 2014; Lawrence et al., 1992). La présence de ces ligands endogènes d'AhR pourrait jouer un rôle dans la régulation des cellules T chez les grands brûlés, ce qui reflèterait sur la réponse immunitaire systémique.

#### **4 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS**

Il est possible que l'exposition à des HAPs puisse avoir un effet à travers AhR sur des maladies inflammatoires chroniques ou aiguës et le système immunitaire en général. Notre hypothèse était que les personnes les plus exposées aux HAPs, soient les pompiers et les grands brûlés, allaient avoir un profil de sous-types de cellules T différent de celui des autres personnes de la population générale. Puisqu'AhR est un récepteur capable de lier plusieurs molécules différentes et d'induire la différenciation des cellules T soit en Th17 ou Treg dépendamment du type de ligand, nous nous sommes attendus à observer une différence dans les cellules Treg et Th17. Notre objectif était de déterminer différents ligands potentiels d'AhR, exogènes et endogènes, capable d'avoir un effet sur la différenciation des cellules Treg et Th17. Nous voulions aussi analyser la proportion des différentes populations de cellules T chez les pompiers et chez des personnes d'un groupe témoin pour faire une comparaison. Ensuite, nous voulions déterminer la présence de ligands d'AhR dans le sérum des grands brûlés et des pompiers. Notre but était de vérifier s'il y avait une différence dans le profil de population de cellules T chez des populations à risques. Finalement, nous voulions confirmer si ces différences étaient causées par la présence d'HAPs ou d'autres substances exogènes capables activer AhR dans le sérum ou par des ligands endogènes produits suite à une brûlure.

## **ARTICLE SCIENTIFIQUE**

### **The role of the aryl hydrocarbon receptor in the control of the immune response**

Le rôle du récepteur des hydrocarbures aromatiques dans le contrôle de la réponse immunitaire

Debbie Lim<sup>1</sup>, Isabelle Perreault<sup>2</sup>, Jacques Bernier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada

<sup>2</sup>Hôtel-Dieu of Montréal, 3840 Saint-Urbain Street, Montréal, QC H2W 1T8, Canada

#### **Contributions**

Debbie Lim a réalisé toutes les expériences, l'acquisition des résultats, la rédaction de l'article, l'analyse et l'interprétation des résultats. La conception et planification du projet ont été réalisées en collaboration avec Jacques Bernier, ainsi que la révision critique du contenu scientifique et des résultats finaux. Dre Isabelle Perreault a aidé à fournir les échantillons des grands brûlés.

Sera soumis dans: Occupational and Environmental Medicine

#### **Résumé de l'article**

Le rôle du récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR) dans le contrôle du système immunitaire demeure encore mal compris. Récemment, il a été démontré que l'activation d'AhR par certains ligands pouvait influencer la différenciation des cellules T. Notre but est d'étudier les effets de différents ligands d'AhR sur la différenciation des cellules Treg et Th17, ainsi que de déterminer les proportions des sous-types de cellules T chez des populations à risques d'expositions aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et d'autres ligands d'AhR, soient les pompiers et les grands brûlés. Suite à la différenciation des cellules CD4<sup>+</sup> en Treg ou Th17 en présence de différents ligands, nous avons observé une augmentation des Treg et Th17 en présence de benzo-a-pyrène, une diminution des Treg par VAF347, bilirubine et kynurénine, puis une diminution des Th17 par l'indirubine. L'analyse par cytométrie en

flux des sous-populations de cellules T chez les pompiers démontre une augmentation des Th17 comparé au groupe contrôle, mais aussi une corrélation positive et négative entre les années d'expérience des pompiers et les cellules Th1 et Th2 respectivement. La présence de ligands d'AhR a aussi été détectée dans les sérums de grands brûlés par le test XRE-luciférase. Cette étude permet de démontrer qu'une exposition à des HAPs ou d'autres ligands d'AhR pourrait potentiellement se retrouver dans l'organisme et affecter le système immunitaire par la modulation de la différenciation des cellules T.

# The role of the aryl hydrocarbon receptor in the control of the immune response

Debbie Lim<sup>1</sup>, Isabelle Perreault<sup>2</sup>, Jacques Bernier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada

<sup>2</sup>Hôtel-Dieu of Montréal, 3840 Saint-Urbain Street, Montréal, QC H2W 1T8, Canada

## Abstract

**BACKGROUND:** The role of aryl hydrocarbon receptor (AhR) on controlling the immune system by the modulation of T cell differentiation is largely unclear.

**OBJECTIVES:** We aim to study the effects of certain AhR ligands on Treg and Th17 cell differentiation, as well as the proportions of T cell subsets in populations most at risk of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and other AhR ligands.

**METHODS:** AhR activation by different ligands used in this study was assessed with XRE-luciferase assay. Human CD4<sup>+</sup> T cells were isolated and culture with Treg- (IL-2, TGF- $\beta$ ) or Th17-differentiating cytokines (IL-6, IL-23, TGF- $\beta$ ) in the presence of different AhR ligand. Results were analyzed with flow cytometry. Proportions of different T cell subsets in firefighters and control donors were measured with flow cytometry. XRE-luciferase assay was also used to determine the presence of AhR ligands in firefighters', control donors' and burn victims' serums.

**RESULTS:** AhR was strongly activated by PAHs compared to most endogenous ligands. Benzo-a-pyrene increased in Treg and Th17 cells, while VAF347, bilirubin and kynurenin decreased Treg cells and indirubin decreased Th17 cells. Firefighters had higher level of Th17 cells compared to control group and correlations were found between Th1 and Th2 cells and firefighters' years of experience. Furthermore, AhR ligands were also detected in burn victims' serums.

**CONCLUSIONS:** Exposure to AhR ligands could affect the immune system by modulating T cell differentiation.

Keywords: Aryl Hydrocarbon receptors (AhR), T cells, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)

## INTRODUCTION

CD4<sup>+</sup> T cells possess an important role in the regulation of the immune response, which consists of a highly regulated network of immune cells. Among these cells, we can find certain subsets capable of inducing an inflammatory response, whereas others play a role in its inhibition and regulation. T helper type 1 cells (Th1) and IL-17-producing T cells (Th17) are best known to enhance pro-inflammatory immunity<sup>1</sup>. On the other hand, regulatory T cells (Treg) and T helper type 2 cells (Th2) are mostly known to regulate and promote anti-inflammatory responses respectively<sup>1</sup>. These specialized subsets, known as effector T cells, differentiate from the naïve T cell (Th0) upon activation after encountering an antigen presented by an antigen presenting cell (APC) and can be distinguished by their cytokine secretion profiles, surface proteins and transcription factors<sup>1</sup>. Recent studies have shown that the differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells can be modulated by a specific receptor, the aryl hydrocarbon receptor (AhR).

The AhR is a ligand-dependent transcription factor from the Per-Arnt-Sim (PAS) superfamily of proteins<sup>2</sup>. AhR mediates many important cellular events in response to halogenated and non-halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by binding the xenobiotic response elements (XRE) and activating transcription of target genes<sup>3</sup>. It is a ubiquitous receptor found in many species and is expressed in various types of cells, which suggests its important and widespread role<sup>2</sup>. The physiological function of AhR is not yet understood, however it is known that AhR plays a role in development, vascularization, metabolism and in the immune system<sup>2,4</sup>. In fact, it has been shown that CD4<sup>+</sup> T cell differentiation can be modulated via AhR activation in a ligand-dependent manner. For example, AhR activation by its ligand 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) favored the differentiation of Treg cells<sup>5,6</sup>, while AhR activation by 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) enhanced the generation of Th17 cell<sup>5,6</sup>.

AhR can bind a wide range of ligands; a list that continues to expand even today. AhR has mostly been studied in the field of toxicology with TCDD as the prototype ligand, mostly due to its capacity to bind AhR with high affinity<sup>2</sup>. AhR has long been thought to only be a sensor for environmental pollutants, responding by inducing the expression of xenobiotic metabolizing enzymes, such as cytochromes P450. AhR has been shown to bind many different environmental PAHs, including benzo-a-pyrene (BaP) and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA). Many PAHs, halogenated or non-halogenated, can be found in large amounts in cigarette smoke, municipal and industrial waste combustion, fossil fuel combustion and forest

fires<sup>7-9</sup>. They are mostly formed in incomplete combustion of organic material, and can exist in both particle and gas phase<sup>10</sup>. However, some endogenous molecules have also been identified as AhR ligands, such as bilirubin, indirubin and kynurenin<sup>3</sup>. Bilirubin and kynurenin have been shown to increase the generation of Treg cells, while indirubin possessed anti-inflammatory effects<sup>11-13</sup>. The discovery of TCDD and FICZ's effects on T cell modulation has elicited more research on these two ligands' capacity to modulate an immune response, however very few studies on other ligands on this topic has been made.

Since many PAHs are present in large amounts during incomplete combustions, the groups of people that are the most exposed to them are firefighters and burn patients. In fact, the smoke from fires can emit a wide variety of PAHs depending on the type of organic material burned<sup>7</sup>. A study has shown that despite wearing full protective ensemble, which included a self-contained breathing apparatus, PAH metabolites could still be found in the body of the firefighters<sup>10</sup>. PAHs were able to penetrate through the gear and come into contact with the skin leading to a cutaneous absorption<sup>10</sup>. Inhalation exposure to the smoke can also occur if there is a premature removal of the protective gear in proximity of the fire. Burn patients are directly exposed to the fires and the smoke that is produced, leading to PAH entry by the respiratory tract and by dermal exposure.

Firefighters are known to have high risks of developing certain types of cancers due to their exposure to known and unknown carcinogens, including PAHs<sup>14</sup>. However, little research has been done on the firefighters' risk of developing other kinds of diseases. On the other hand, despite many research on the immune response of burn patients, and also of trauma patients, our comprehension of its mechanisms is still incomplete. In fact, in many of these patients, we observe a proinflammatory phase characterized by the systemic inflammatory response syndrome (SIRS), followed by an anti-inflammatory phase, the compensatory anti-inflammatory syndrome (CARS), which renders the patients susceptible to infections and can lead to multiple organ dysfunction (MODS) and death<sup>15</sup>. The stress and activated cytokine milieu after a trauma is often accompanied by metabolic and nutritional effects, such as hypermetabolism, protein catabolism, altered fat, glucose and trace mineral metabolism, thus forming or liberating potential endogenous AhR ligands<sup>16</sup>. We suggest that PAHs and endogenous ligands modulate T cell differentiation via AhR activation, which will play an important role in controlling the immune response of a thermal injury and possibly foresee firefighters' risk of developing an immune disorder. In this study, we have shown that AhR can strongly be activated by PAHs and certain endogenous ligands. Furthermore, activation by these ligands seems to have an effect on T cell differentiation. The populations of T cell subsets differ between control group and

firefighters, correlations are seen between the amount of firefighters' years of experience and T cell subsets. Finally, serums from burn patients can activate AhR, which indicates the presence of potential ligands.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Burn patients, firefighters and healthy donors*

The ethics committee of INRS Armand-Frappier Institute approved the study protocol and all firefighters gave written informed consent. Serum samples of burn patients were collected from and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ <sup>17</sup>. Blood samples came from adult patients admitted within 24 hours of thermal injury, exceeding 20% of total burn surface area (TBSA)<sup>17</sup>. The exclusion criteria were age >65 years; TBSA >80%; pregnancy; chronic respiratory, cardiac, or renal deficiency; autoimmune pathologies and cancer<sup>17</sup>. The serums used in this experiment were randomly chosen. Blood samples were collected from two groups of firefighters: 10 or less years of experience and 20 or more years of experience. For the control group, healthy non-smoking adult donors were recruited.

### *Chemicals and Reagents*

The AhR agonist, VAF347, was purchased from EMD Millipore (Billerica, MA) with  $\geq 99\%$  purity and was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 10 mg/ml. The other AhR ligands, such as bilirubin, L-kynurenin and benzo[a]pyrene (BaP) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO) with purities  $\geq 96\%$ . BaP was dissolved in DMSO at 10 mM, while kynurenin was dissolved in a 0.5 M HCl solution at 50 mg/ml and bilirubin was dissolved in 1 mM NaOH solution at 20 mg/ml with a few drops of 2 M NaOH solution until the powder completely dissolved. Indirubin was purchased from Enzo Life Sciences with  $\geq 98\%$  purity and was dissolved in DMSO at 10 mg/ml.

### *Luciferase Assay*

A human liver carcinoma cell line HePG2, was cotransfected with a xenobiotic response element (XRE)-driven firefly luciferase reporter gene and a cytomegalovirus (CMV)-driven

Renilla luciferase reporter gene for normalization (QIAGEN, Toronto, Ontario) following the manufacturer instructions. Briefly,  $3 \times 10^5$  cells were seeded in each well of a 24-well plate overnight in complete DMEM (Gibco, Mississauga, Ontario) supplemented with 10% FBS, 25 mM HEPES (Gibco), 100 U/ml penicillin (Gibco) and 100 µg/ml streptomycin (Gibco). Media was changed the next day to Opti-MEM supplemented with 5% FBS and no antibiotics. Cells were transfected with the XRE-luciferase plasmid at 1 µg per well using lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen, Burlington, Ontario) for 24 hours. Media was changed to Opti-MEM, supplemented with 0.5% FBS and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100µg/ml streptomycin) and treated with different concentrations of BaP, indirubin, VAF347, bilirubin and kynurénine (Kyn) for 18 hours. Cell lysis and addition of Firefly luciferase substrate were done using Dual-Glo Luciferase Assay System kit (Promega, Madison, WI). The luciferase assay was performed using a 1450 MicroBeta Trilux (PerkinElmer, Shelton, CT). The same kit was used to quench Firefly luciferase signal and add Renilla luciferase substrate. The relative luciferase unit is the indicator of Firefly luciferase expression level, normalized on the Renilla luciferase expression level. All experiments were repeated three times in duplicate.

Luciferase assay was also performed as previously described with serums from firefighters and burn patients. These serums were inactivated by heating at 65°C for 30 minutes. Transfected cells were treated with 20% serum from firefighters or burn patients in Opti-MEM media containing antibiotics (100 U/ml penicillin and 100µg/ml streptomycin) for 18 hours. 25 nM BaP was added to each well at the same time as the serums to ensure that the luciferase signal was above the limit of detection. 20% FBS was used as a negative serum control.

### *Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells*

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from whole blood of healthy volunteers or firefighters. Whole blood was diluted in PBS 1X in a 1:1 ratio and gently placed on a density medium Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Sweden) in a 50ml centrifuge tube. The tube was centrifuged at 1300 rpm for 30 minutes. PBMCs were collected from the Ficoll-Paque Plus-plasma interface, placed in a new 50 ml tube and washed three times with PBS 1X. The PBMCs were counted and blue Trypan exclusion assay was used to measure cell viability. PBMCs used were always above 95% viability.

### *Flow Cytometry and Intracellular Transcription Factor and Cytokine Staining*

PBMCs were seeded in a 24-well plate at  $1 \times 10^6$  cell/ml and stimulated with 50 ng/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 1  $\mu$ g/ml ionomycin and 1  $\mu$ g/ml brefeldin A for 5 hours at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. After washing once with PBS 1X, cells were transferred into 1.5 ml microcentrifuge tubes at  $5 \times 10^5$  –  $1 \times 10^6$  cells/tube. Non-specific binding was blocked by adding 1  $\mu$ g of human IgG. Staining for different cell subsets were: Th1 (2  $\mu$ l anti-CD4-FITC (BioLegend), 2  $\mu$ l anti-Tbet-PE/Cy7 (BioLegend)), Th2 (2  $\mu$ l anti-CD4-FITC, 3  $\mu$ l anti-GATA-3-PE/Cy7 (FisherScientific, Nepean, ON)), Th17 (2  $\mu$ l anti-CD4-PE/Cy7 (BioLegend), 3  $\mu$ l anti-IL-17-FITC (BioLegend), 2  $\mu$ l anti-ROR $\gamma$ t-PE (eBioscience, San Diego, CA)), Th22 (2  $\mu$ l anti-CD4-PE/Cy7, 3  $\mu$ l anti-IL-17-FITC, 3  $\mu$ l anti-IL-22-PE (BioLegend)), Treg (2  $\mu$ l anti-CD4-FITC, 3  $\mu$ l anti-CD25-PE (BioLegend), 2  $\mu$ l anti-Foxp3-PE/Cy7 (eBioscience)).

Briefly, cells were stained with cell surface antibodies for 30 minutes on ice in the dark and washed before they were fixed and permeabilized using Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience) following the manufacturer instructions. Cells were then stained with intracellular antibodies for 45 minutes at room temperature and washed twice with 1X Permeabilization Buffer from the kit before analysis on FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey).

### *Isolation of CD4<sup>+</sup> T cells and T cell differentiation*

CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from whole blood of healthy volunteers using a RosetteSep Human T cell Enrichment kit (Stemcell Technologies, Vancouver, British Columbia) following the manufacturer instructions. 40  $\mu$ l/ml of antibody cocktail was added to whole blood and incubated at room temperature for 20 minutes. Isolation of T cells was performed in the same way as was described previously for PBMC isolation. After washing cells, they were seeded in anti-CD3 and anti-CD28-coated 24-well plate (5  $\mu$ g/ml anti-CD3, 3  $\mu$ g/ml anti-CD28) at  $1 \times 10^6$  cells/well in X-VIVO 15 (Lonza, Switzerland). Flow cytometry was performed as described in the previous paragraph.

### *Statistical analysis*

A Kruskal-Wallis test was used to evaluate the differences between multiple groups. Linear regression was used to analyze the correlation between the proportions of T cell subsets and

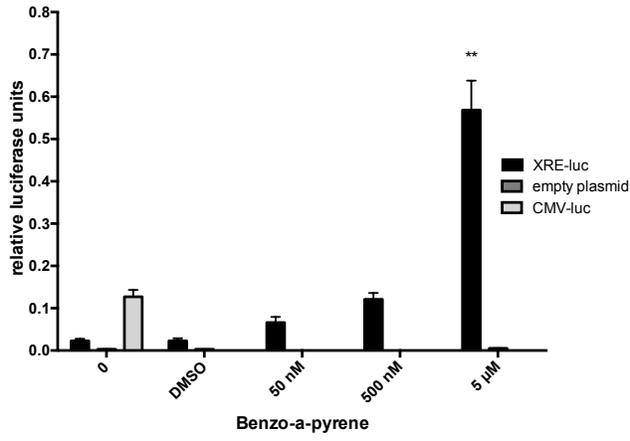
the years of experience of firefighters. Experiments were performed in triplicates or quadruplicates unless specifically indicated otherwise.  $P < 0.05$  was considered significant in all analyses.

## RESULTS

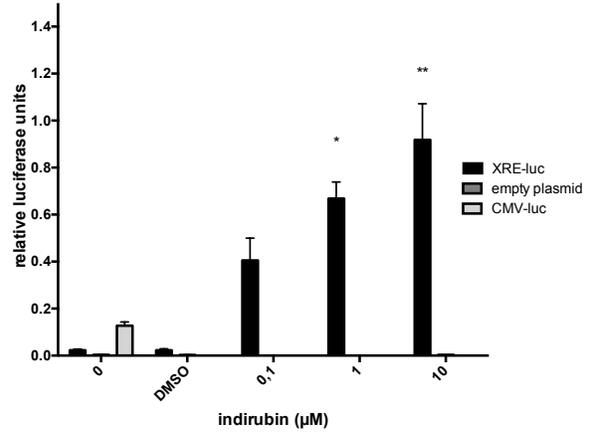
### Induction of AhR activity by PAHs and endogenous ligands

In order to verify the actions of our chosen ligands on AhR activity, XRE-luciferase assay was performed in a HepG2 cell line. For each ligand, concentrations were chosen based on literature and a dose-response curve (data not shown), eliminating the concentrations that induced significant cell death. For BaP, we can see a dose-dependent increase in AhR activation, with a response at 500 nM comparable to the positive plasmid control and a significant response at 5  $\mu$ M compared to DMSO (**Fig. 1a**). However, at 5  $\mu$ M, cell death was observed by blue Trypan exclusion assay, and was thus removed from further studies. Next, we tested indirubin and noted a strong activation of AhR in a dose-dependent manner (**Fig. 1b**). In the case of bilirubin and kynurenin, endogenous ligands, we observed a little increase or none in AhR activation respectively (**Fig. 1c, 1d**). AhR activation from bilirubin and kynurenin were relatively stable. As expected, VAF347 activated AhR as strongly as the positive plasmid control, with a significant response at 75 nM (**Fig. 1e**). Thus, most of our ligands were able to induce the activation of AhR. Bilirubin and Kynurenin were used in the following experiments despite their inability to significantly induce AhR activation due to their known effects in literature.

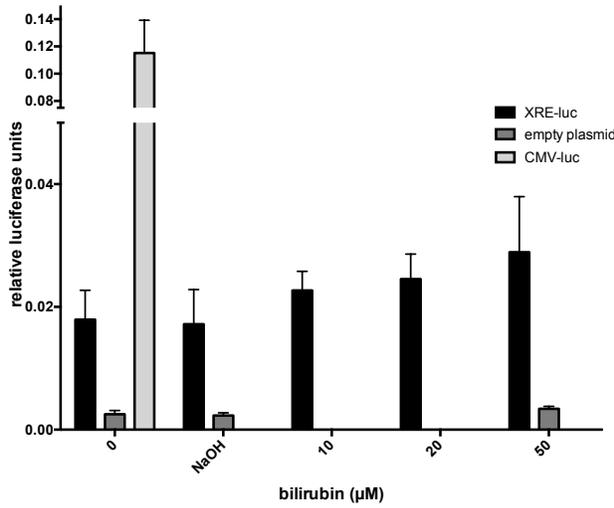
a)



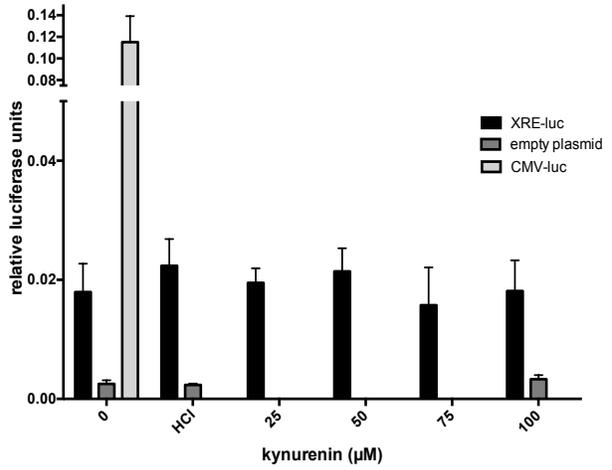
b)



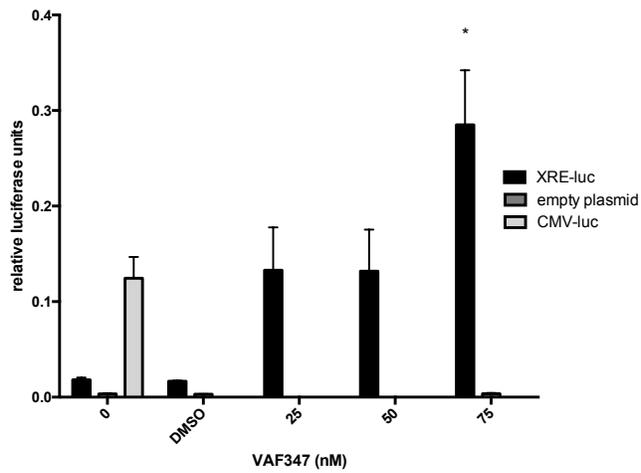
c)



d)



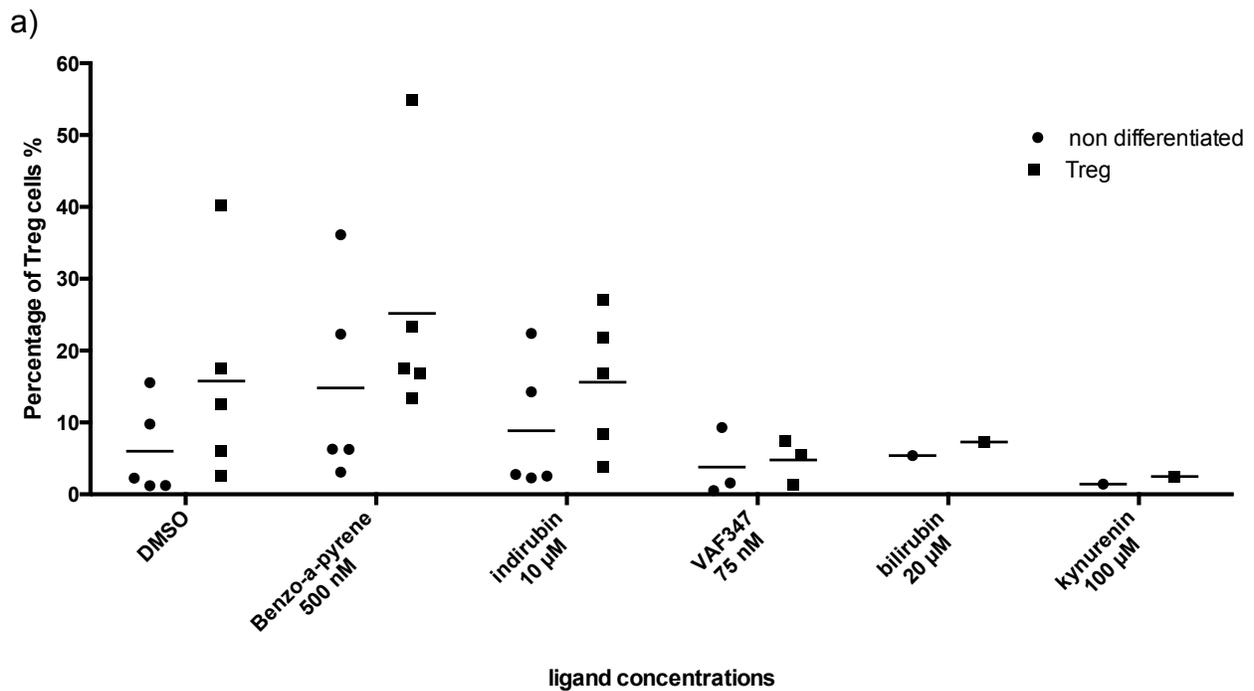
e)

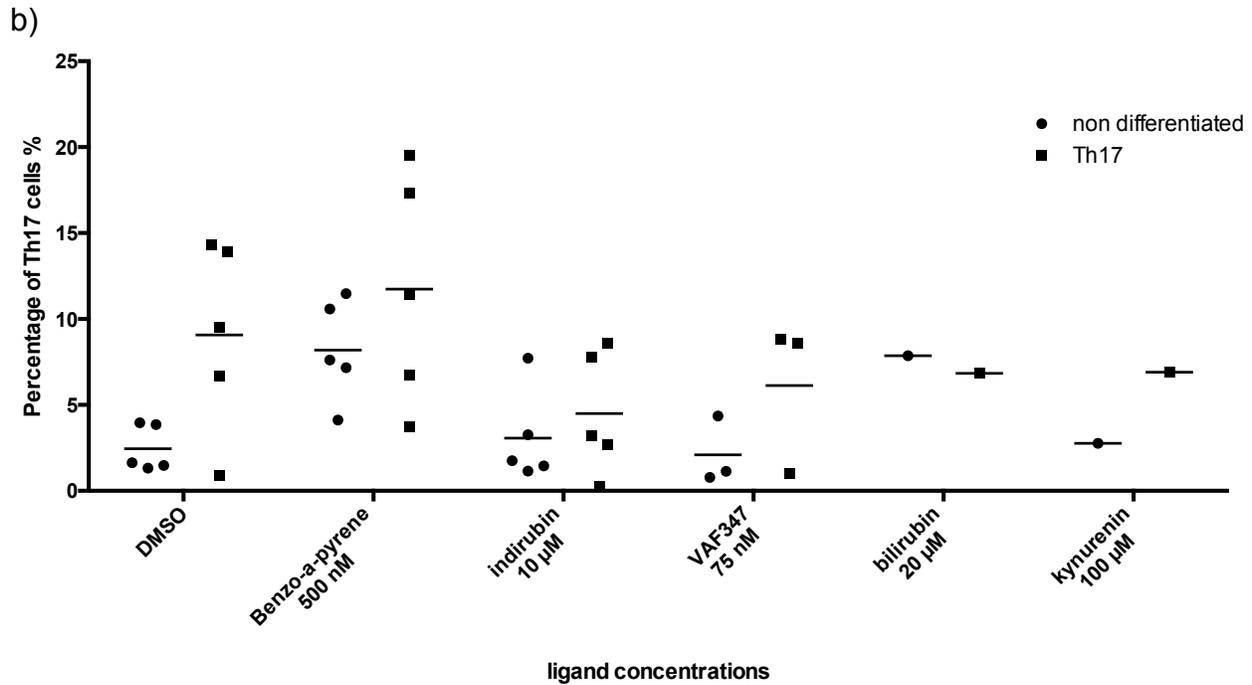


**Figure 1** AhR activation by different ligands in a XRE-luciferase assay. The ligands used were a) Benzo-a-pyrene, b) indirubin, c) bilirubin, d) kynurenin and e) VAF347. Firefly luciferase activity was normalized to the *Renilla* luciferase activity of a co-transfected control (mean + s.e.m. of triplicates or quadruplicates). A constitutively expressed CMV-luciferase construct was used as a positive control. A Kruskal-Wallis was used. \*: P < 0.05; \*\*: P < 0.01

## Effects of the ligands on T cell differentiation

Since other studies have frequently shown an AhR-mediated modulation of T cell differentiation, the effects of our ligands on Treg and Th17 cell differentiation were studied. CD4<sup>+</sup> naïve T cells were cultured in Treg- or Th17-promoting conditions in the presence of different ligands. The concentration of each ligand was chosen based on the previous experiment, at levels that activated AhR without causing cell death.



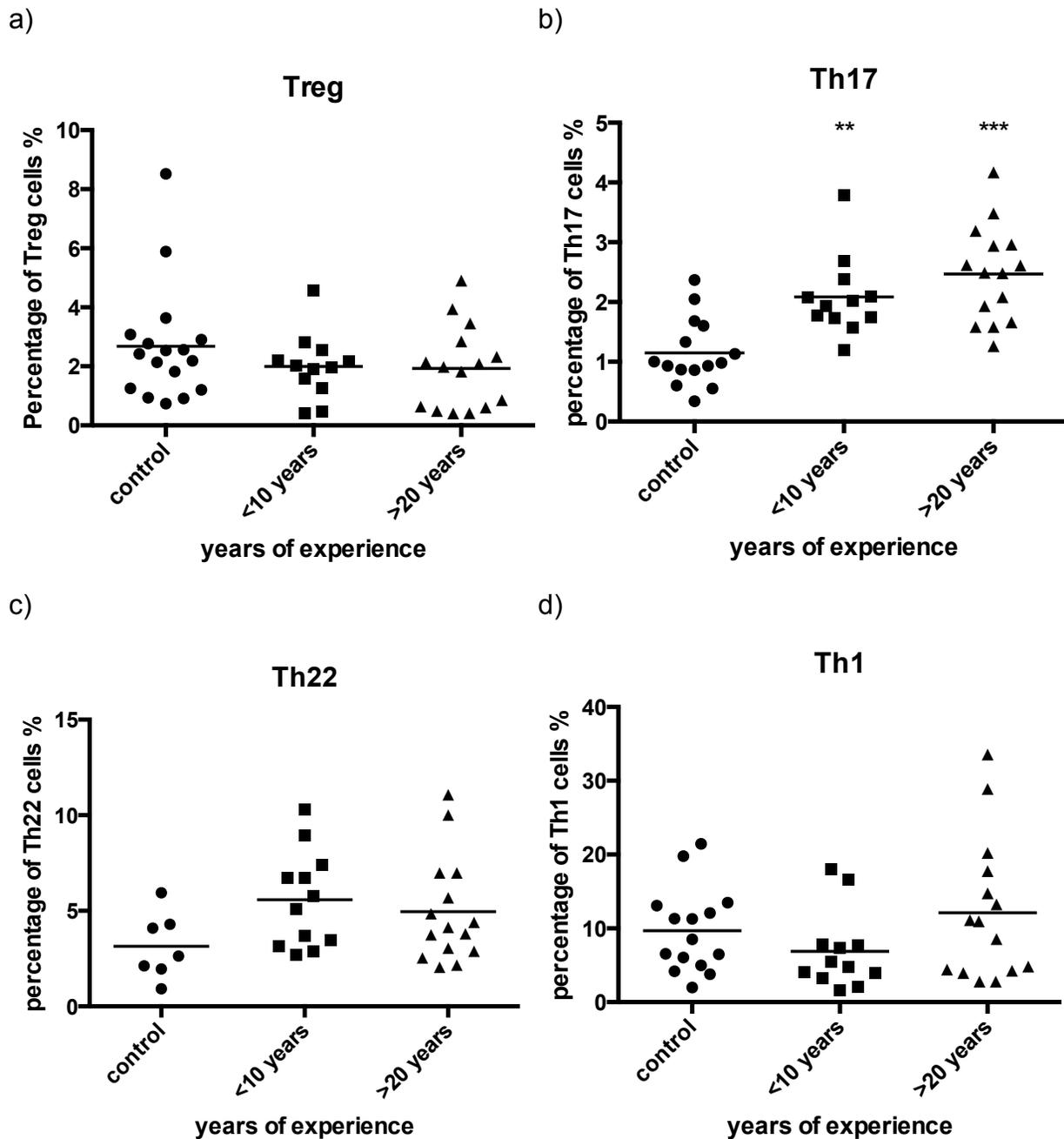


**Figure 2** The effects of AhR ligands on the differentiation of Treg and Th17 cells in conditions promoting Treg or Th17 cells respectively and in a non-differentiated condition. a) Percentage of Treg differentiated cells in a non-differentiated condition (circles) or Treg-promoting condition (squares), treated with AhR ligands. b) Percentage of Th17 differentiated cells in a non-differentiated condition (circles) or Treg-promoting condition (squares), treated with AhR ligands. n=5: DMSO, Benzo-a-pyrene, indirubin; n=3: VAF347; n=1: bilirubin, kynurenin. Kruskal-Wallis test was used, with  $P < 0.05$

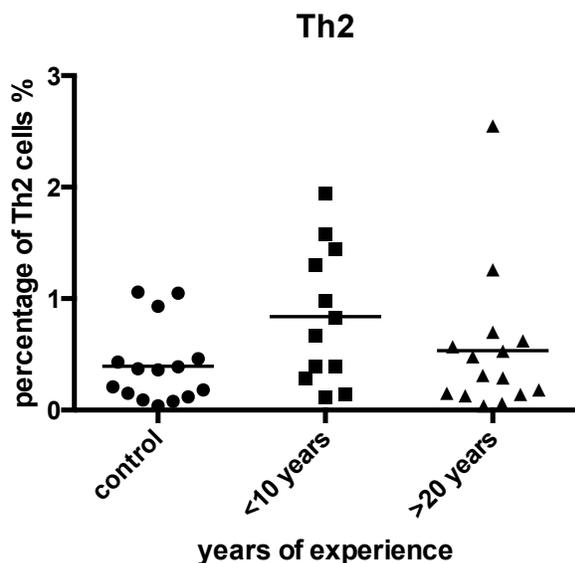
When we compared the Treg cells to the non-differentiated cells, we observed a slight increase of Treg cells when the naïve T cells were treated with Benzo-a-pyrene compared to the DMSO control (**Fig. 2a**). The use of other ligands, such as VAF347, bilirubin and kynurenin, did not have any effect on the amount of Treg cells. The same result was observed when the cells had been placed in the Treg-promoting condition, except at a higher percentage. We saw a slight increase of Treg cells when treated with Benzo-a-pyrene compared to the DMSO control (**Fig. 2a**). On the other hand, when we compared the Th17 cells to the non-differentiated cells, we observed a slight increase with Benzo-a-pyrene and bilirubin in the number of Th17 differentiated cells compared to DMSO. However, treatment with indirubin, kynurenin and VAF347 made no differences in the proportion of Th17 cells (**Fig. 2b**). Indirubin also decreased the amount of Th17 differentiated cells compared to DMSO (**Fig 2b**). Although we did observe some differences in the percentage of Treg and Th17 cells when treated with different AhR

ligands, there were either many variations in the results, or the repeats of the experiments were too low to be statistically significant. Thus, in both Treg- and Th17-promoting conditions, we observe a trend in the effects of the different ligands, such as an increase in Treg and Th17 cells in the presence of Benzo-a-pyrene, while VAF347, bilirubin and kynurenin decrease Treg cells and indirubin decrease Th17 cells.

### Proportions of T cell subsets in firefighters compared to control group



e)



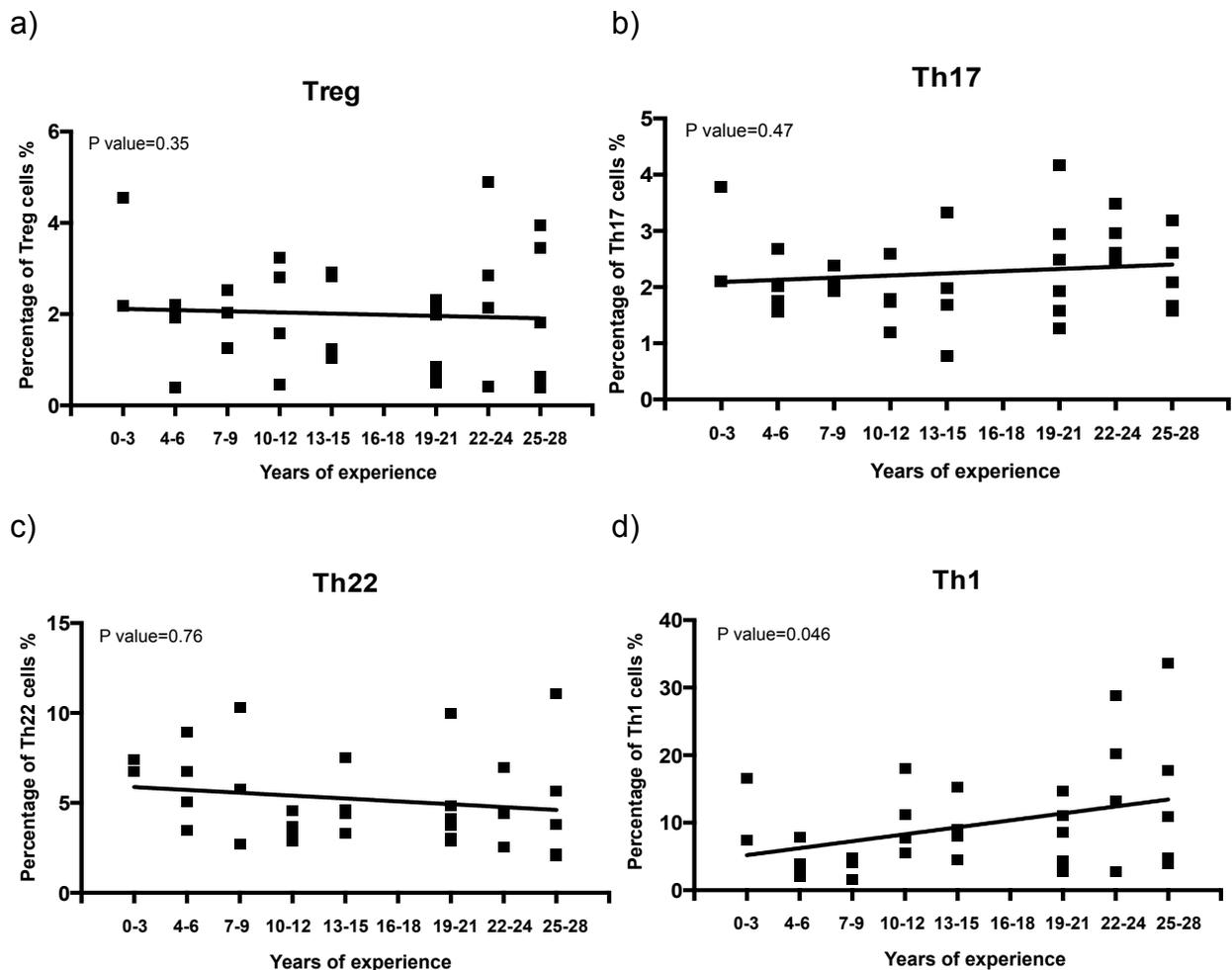
**Figure 3** Proportions of T cell subsets in healthy non-smoking control donors and firefighters with less than 10 years and over 20 years of experience. T cell subsets analyzed were: a) Treg, b) Th17, c) Th22, d) Th1 and e) Th2. Statistical analyses were done with Kruskal-Wallis test or one-way ANOVA, comparing the two groups of firefighters with the control group,  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*)

After having shown that certain AhR ligands had effects on the differentiation of T cells, we proceeded to see if these effects were observable in people exposed to potential sources of ligands, such as smoke from fires. We analyzed different T cell subsets in a control group of healthy non-smoking donors and two groups of firefighters with different years of experience. The amount of Treg cells measured did not show any differences between the control group and the group of firefighters with ten or less years of experience, nor with the group of twenty or more years of experience (**Fig. 3a**). However, the Th17 cell population was significantly increased from 1% to 2% in the first group of firefighters compared to the control group (**Fig. 3b**). This increase in Th17 cells was even more pronounced in the second group, going from 1% to approximately 2.5%. Thus, the amount of Th17 cells increases as the firefighters acquire years of experience, whereas, for the Th22, Th1 and Th2 cells, their proportions in both groups of firefighters remained relatively stable compared to the control group (**Fig. 3c, 3d, 3e**). Some slight variations could be seen, although they remained statistically non-significant. For example, Th22 cells were slightly increased in both groups of firefighters compared to the

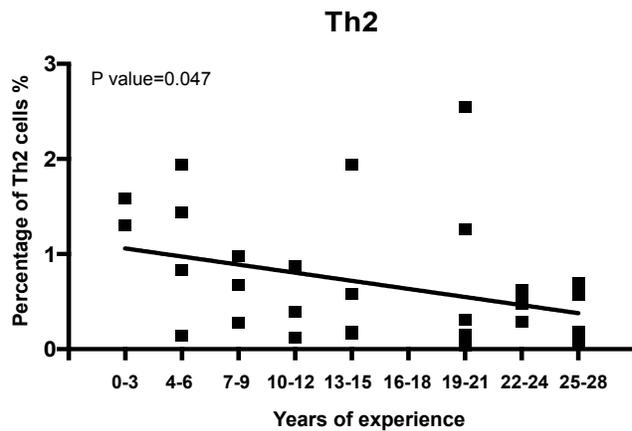
control group, while there was a slight reduction of Th1 in the first group of firefighters and a little increase in Th2 cells in the first group as well. Thus, we were able to demonstrate a significant increase in Th17 cells in firefighters depending of the years of experience they possessed compared to the control group. Although we did not observe significant changes in the proportion of other T cell subsets, there were some slight variations seen in Th22, Th1 and Th2 cell subsets.

### Correlation between proportion of T cell subsets and firefighters' years of experience

Figure 4 shows the analysis of the proportions of each T cell subset compared to the amount of years of experience in firefighters.



e)



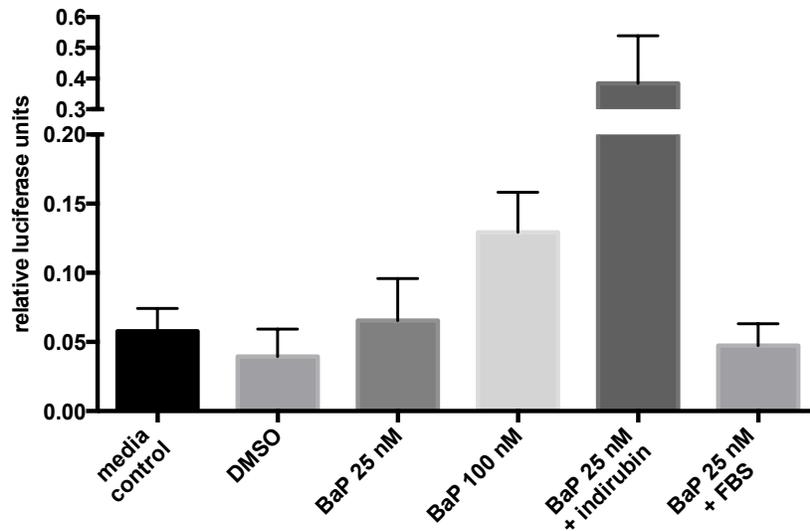
**Figure 4** Correlation between proportions of T cell subsets and years of experience of firefighters grouped in intervals of three years. Linear regression was used for the statistical analyses.  $P < 0.05$  was considered significant.

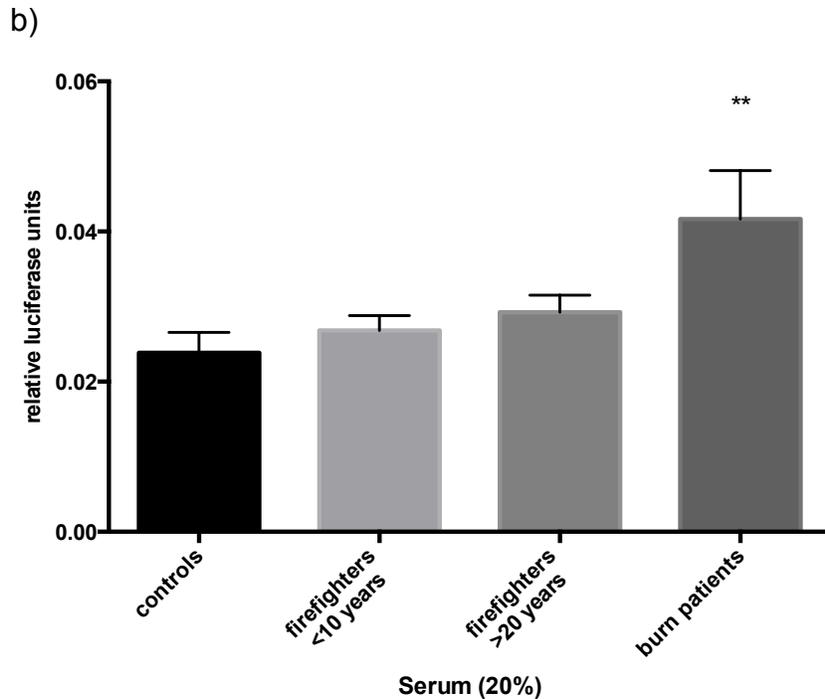
We observed the relatively stable amount of Treg, Th17 and Th22 cells in firefighters throughout the years (**Fig. 4a, 4b and 4c**). However, there was a significantly positive correlation between the proportion of Th1 cells and the years of experience of firefighters (**Fig. 4d**). On the other hand, the proportions of Th2 cells decreased significantly throughout the years (**Fig. 4e**). These data demonstrate a positive and negative correlation with the firefighter' years of experience for Th1 and Th2 cells respectively. Although no correlations or trends were observed for Treg, Th17 and Th22 cells, slight variations are still seen in those subsets.

## Induction of AhR activity by firefighters' and burn patients' serum

Since we have shown that firefighters have an elevated amount of Th17 cells compared to a control group, we verified if their serums contained any potential AhR ligands using the XRE-luciferase assay. We first determined the kit's limit of detection by doing a dose-response curve with BaP (data not shown). 25 nM BaP was the concentration at which the luciferase response was detected. That dose was used as a base concentration added to every test to ensure that the ligands present in the serums would be over the limit of detection.

a)





**Figure 5** AhR activation by serums in a XRE-luciferase assay. a) 25 nM BaP was used as a base concentration to ensure that AhR activation was over the kit's limit of detection. The use of 100 nM BaP and 25 nM BaP with 0.1  $\mu$ M indirubin were used as a positive ligand control and to test the additive effect of ligands respectively. 25 nM BaP with 20% FBS was used as a negative serum control. b) AhR activation by 25 nM BaP with 20% of serum from the control group, from both groups of firefighters separated by their years of experience, and from the burn patients. AhR activity in both firefighter groups and from the burn patients was compared to the response from the control groups.  $P < 0.01$  (\*\*), n=15: controls, firefighters >20 years; n=12: firefighters <10 years; n=10: burn patients

The additive effect of the ligands was tested by adding 0.1  $\mu$ M indirubin to the 25 nM BaP and, as expected, showed an increase of the AhR activation (**Fig. 5a**). 100 nM BaP was also used as a positive ligand control for the assay (**Fig. 5a**). FBS was used as a negative serum control to verify any presence of AhR activation, which was not the case (**Fig. 5a**). We exposed the transfected XRE-luciferase HepG2 cells to 20% of inactivated serum from a healthy control group, our two groups of firefighters with different years of experience and the burn patients. We first analyzed the AhR activation from the serums of the firefighters. Compared to the control group, we observed a slight increase of AhR activation with the serum of firefighters with <10 years of experience (**Fig. 5b**). Furthermore, this induction was a bit higher in the second group of firefighters with >20 years of experience. Finally, the group of burn patients showed a significant increase in AhR activation compared to the control group (**Fig. 5b**). Thus, we were able to show a significant increase in AhR activation from the burn patients' serum, and a slight increase with the firefighters' serum compared to the control serum.

## DISCUSSION

In this study, we showed that different ligands were able to induce the activation of AhR. We observed the effects of these different AhR ligands on T cell differentiation in Treg- and Th17-promoting conditions. BaP was able to increase Treg and Th17 cells, whereas VAF347, bilirubin and kynurenin decreased Treg cells and indirubin decreased Th17 cells. Firefighters, who are frequently exposed to sources of PAHs, potential AhR ligands, were shown to have an increase in Th17 cells depending on the years of experience they possessed compared to the control group. Other variations were seen in Th22, Th1 and Th2 cell subsets, although these changes were non significant. Furthermore, the data demonstrated a positive correlation between the years of experience of a firefighter and Th1 cells, and a negative correlation with Th2 cells. Finally, the analyses of serums from burn patients and firefighters showed the presence of AhR ligands. Burn patients' serum were able to significantly induce AhR activation, while firefighter' serums slightly increased AhR activation compared to the control group. The experiments were done once and would have to be repeated to confirm the results.

It is well accepted that AhR activation is able to influence T cell differentiation in a ligand-dependent manner<sup>5,6</sup>. However, the list of substances capable of having an effect on T cell differentiation is still incomplete due to the limited amount of studies on other ligands apart from TCDD and FICZ. Here we observed the effects of other ligands on T cell differentiation and were able to show some modulating effects of certain ligands. In addition, we know that the probability of being exposed to an individual substance in the environment is highly unlikely, since environmental pollutants are mostly found in complex mixtures. Some substances can be found in larger quantities in the mixtures, however many other trace molecules may be present. However, given that every ligand has a different binding affinity to AhR, certain trace molecules might be able to activate AhR even at very low concentrations, such as TCDD. The molecule's ability to enter the organism is another aspect to consider. The chemical characteristics and structure of every substance would have to be assessed in order to determine their entry pathway. The complex mixture found in the environment is also dependent on the materials and the processes that emit the substances. Thus, it is extremely challenging to recreate an experimental *in vitro* model using a mixture of substances that reflect the true extent of our exposure. Other than BaP, other PAHs in smoke would have to be analyzed in order to determine which substances are more predominant and to test their ability to activate AhR and to modulate T cell differentiation.

The reason why BaP increased Treg and Th17 cells, while VAF347, bilirubin and kynurenin decreased Treg cells and indirubin decreased Th17 cells is not known. In fact, because AhR has not yet been crystallized, the mechanisms of AhR activation and its functions are still not completely understood<sup>4</sup>. Information on its conformation, the way AhR binds to different ligands and its ligand-dependent structural changes are currently lacking<sup>4</sup>. AhR's ability to bind to a multitude of molecules allows us to suspect that AhR could not only bind a parent substance, but also its metabolites. The effects seen in a cell could then be indirectly caused by AhR activation either by a parent substance or by its metabolites, or it could be caused by a direct effect from the substance itself or its metabolites whether AhR was activated or not. It would then be difficult to differentiate an effect caused by AhR's activation or directly by the substances themselves. For example, cytochrome P450 enzymes metabolizes BaP to form quinones and epoxides that are redox active and form DNA adducts respectively<sup>8</sup>. It is possible that certain metabolites might be able to alter the cell's genome without leading to its death, resulting in an altered gene expression. BaP is also a known carcinogen, able to promote the proliferation of certain types of cells<sup>18</sup>. BaP could then promote the proliferation of other cells, such as T cells, which would be different from the generation of new T effector cells. Furthermore, AhR is able to bind indirubin and kynurenin, both tryptophan metabolites. It would be interesting to see if AhR is also capable of binding tryptophan or its other metabolites. Thus, elucidating how AhR is activated and by which molecule, AhR's mechanism of action and whether AhR will act directly or indirectly to change gene expression or cellular function will help to understand its functions.

The importance of the physiological role of AhR suggests the existence of an endogenous ligand. Many endogenous proteins have been identified to possess some ability to activate AhR, such as bilirubin, kynurenin, indirubin, tryptamine and low-density lipoprotein<sup>3</sup>. However, the affinity with which they bind AhR appears to be many folds lower than most classic exogenous ligands<sup>3</sup>. In our study, most of the endogenous ligands had little or no ability to activate AhR, but it is possible that an endogenous ligand's low binding affinity to AhR is sufficient to induce a physiological effect. Since AhR is known to play a role in development and is present on many cells, we can suggest that multiple endogenous ligands exist and induce different AhR functions. AhR activation could then lead to different responses depending on its environment. In the case of burn patients, it is not unusual to observe hypermetabolism, protein catabolism and altered fat, glucose and trace mineral metabolism. These changes can form or release a substantial amount of proteins, which are not normally present in such high concentrations, and may potentially activate AhR. The burn patients' serums used in this study had the ability to

significantly activate AhR, suggesting the presence of ligands. However, AhR activation by endogenous molecules needs further investigation in order to identify which ligands have an effect on T cell differentiation.

If we consider the fact that complex mixtures of PAHs and potential AhR ligands are released into the environment during fires, the exposure that firefighters and burn patients face are also consisted of that mixture. From our analyses of T cell subsets, only Th17 cells seem to be significantly increased in firefighters compared to a control group. Th22 cells also seem to lean toward an increasing trend. Although the amount of Th1 and Th2 cells were not significantly different from the control group, a positive and negative correlation between Th1 and Th2 cells and the amount of years of experience of firefighters was respectively significant. Despite a low AhR activation with the firefighters' serum, the difference in Th17 cell populations was significant. It is possible that XRE is not the only DNA sequence that AhR can bind, rendering our luciferase assay less efficient. In fact, AhR is also known to be able to interact with other proteins, such as NF- $\kappa$ B subunits, RelA and RelB, estrogen receptor and c-Maf<sup>19-21</sup>. The fact that AhR can directly interact with other transcription factors or receptors shows that it does not only mediate its actions by regulating gene expression, but by directly altering other protein's functions. If an activated AhR by endogenous ligands mediates its activity by direct interaction with other regulation proteins, then the activation of AhR could have been overlooked in the luciferase assay. Thus, it is necessary to study the mechanisms of AhR activation by different molecules in order to identify the effect of each potential ligand.

In conclusion, firefighters are susceptible to an unusually large amount of environmental pollutants compared to the average person, which can result in changes in T cell populations and possibly in other types of cells. Not only firefighters, but burn victims are also particularly exposed to such substances, especially when the protection from their skin has been compromised. The serums from such patients bear some evidence of the presence of AhR ligands, originating either by inhalation and absorption of exogenous substances or by the formation of endogenous ligands due to the metabolic changes. The effects on the firefighters' immune system due to occupational exposure to PAHs and other substances released in the smoke have not yet been fully investigated. This study could help elucidate the extent of which these environmental pollutants affect our health.

## References

1. Broere F, Apasov SG, Sitkovsky M V, Eden W Van. T cell subsets and T cell-mediated immunity. Nijkamp FP, Parnham MJ, eds. 2011:15–28. doi:10.1007/978-3-0346-0136-8.
2. Stevens E, Mezrich J, Bradfield C. The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology*. 2009;127(3):299–311. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03054.x.
3. Nguyen LPL, Bradfield CAC. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem Res Toxicol*. 2007;21(1):102–116. doi:10.1021/tx7001965.
4. Esser C, Rannug A, Stockinger B. The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends Immunol*. 2009;30(9):447–454. doi:10.1016/j.it.2009.06.005.
5. Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, et al. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2008;453(7191):65–71. doi:10.1038/nature06880.
6. Veldhoen M, Hirota K, Westendorf A. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*. 2008;453(7191):106–109. doi:10.1038/nature06881.
7. Simoneit BR. *Biomass burning — a review of organic tracers for smoke from incomplete combustion*; 2002. doi:10.1016/S0883-2927(01)00061-0.
8. Uno S, Makishima M. Benzo[a]pyrene Toxicity and Inflammatory Disease. *Curr Rheumatol Rev*. 2009;5(4):266–271. doi:10.2174/157339709790192549.
9. Guillon a., Le Ménach K, Flaud P-M, Marchand N, Budzinski H, Villenave E. Chemical characterization and stable carbon isotopic composition of particulate Polycyclic Aromatic Hydrocarbons issued from combustion of 10 Mediterranean woods. *Atmos Chem Phys*. 2013;13(5):2703–2719. doi:10.5194/acp-13-2703-2013.
10. Fent KW, Eisenberg J, Snawder J, et al. Systemic Exposure to PAHs and Benzene in Firefighters Suppressing Controlled Structure Fires. *Ann Occup Hyg*. 2014:1–16. doi:10.1093/annhyg/meu036.
11. Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Burlingham WJ, Bradfield C a. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol*. 2010;185(6):3190–8. doi:10.4049/jimmunol.0903670.

12. Benson JM, Shepherd DM. Dietary ligands of the aryl hydrocarbon receptor induce anti-inflammatory and immunoregulatory effects on murine dendritic cells. *Toxicol Sci.* 2011;124(2):327–38. doi:10.1093/toxsci/kfr249.
13. Rocuts F, Zhang X, Yan J, et al. Bilirubin promotes de novo generation of T regulatory cells. *Cell Transplant.* 2010;19(4):443–51. doi:10.3727/096368909X484680.
14. Youakim S. Risk of cancer among firefighters: a quantitative review of selected malignancies. *Arch Environ Occup Health.* 61(5):223–231. doi:10.3200/AEOH.61.5.223-231.
15. Mannick J a, Rodrick ML, Lederer J a. The immunologic response to injury. *J Am Coll Surg.* 2001;193(3):237–44. doi:10.1016/S1072-7515(01)01011-0.
16. O'sullivan S, O'Connor T. Immunosuppression following thermal injury : the pathogenesis of immunodysfunction. *Br J Plast Surg.* 1997;50:615–623. doi:10.1016/S0007-1226(97)90507-5.
17. Garrel D, Patenaude J, Nedelec B, et al. Decreased mortality and infectious morbidity in adult burn patients given enteral glutamine supplements: a prospective, controlled, randomized clinical trial. *Crit Care Med.* 2003;31(10):2444–9. doi:10.1097/01.CCM.0000084848.63691.1E.
18. Kometani T, Yoshino I, Miura N, et al. Benzo[a]pyrene promotes proliferation of human lung cancer cells by accelerating the epidermal growth factor receptor signaling pathway. *Cancer Lett.* 2009;278(1):27–33. doi:10.1016/j.canlet.2008.12.017.
19. Apetoh L, Quintana FJ, Pot C, et al. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat Immunol.* 2010;11(9):854–861. doi:10.1038/ni.1912.
20. Klinge CM, Kaur K, Swanson HI. The aryl hydrocarbon receptor interacts with estrogen receptor alpha and orphan receptors COUP-TFI and ERRalpha1. *Arch Biochem Biophys.* 2000;373(1):163–74. doi:10.1006/abbi.1999.1552.
21. Kim DW, Gazourian L, Quadri S a, Romieu-Mourez R, Sherr DH, Sonenshein GE. The RelA NF-kappaB subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. *Oncogene.* 2000;19(48):5498–506. doi:10.1038/sj.onc.1203945.

## CONCLUSION

D'après nos résultats et d'autres études précédentes, nous savons que les cellules Treg et Th17 peuvent être modulées par différents ligands via AhR. De plus, les Th1 et les Th2 démontrent une corrélation positive et négative, respectivement, avec les années d'expérience des pompiers. Ces résultats permettent d'émettre l'existence d'un lien direct entre la réponse immune et les substances toxiques environnementaux. La présence de ligands pouvant activer AhR dans les sérums de grands brûlés est un autre résultat qui soutient ce lien. D'ailleurs, en sachant que le facteur de transcription maître des cellules Th22 est AhR, nous pouvons supposer que ces cellules sont aussi affectées par l'activation du AhR par différents ligands. De plus, les Th22 sont des cellules qui se retrouvent plutôt dans les tissus épithéliaux qu'en circulation, donc l'isolation périphérique de ces cellules devient plus difficile (Eyerich et al., 2009). Elles sont impliquées dans l'immunité épidermale ainsi que dans des troubles inflammatoires de la peau comme le psoriasis et la dermatite atopique (Eyerich et al., 2009; Zhang et al., 2011). En sachant que leur rôle effectrice se manifeste dans les tissus et non en périphérie, il est possible que les cellules Th22 isolées des PBMC ne soient pas représentatives de la réponse de ces cellules aux ligands d'AhR. En effet, étant donné que les Th22 résident dans l'épiderme et ont un rôle dans son immunité, il est possible de considérer que ces cellules sont exposées à une multitude de molécules et de microorganismes exogènes. Si des HAPs arrivent à pénétrer la surface de la peau par diffusion passive due à leur composition chimique, les Th22 seraient une des premières cellules à être exposées à ces agents toxiques. L'expression d'AhR chez ces cellules pourrait permettre aux Th22 de répondre à ces substances. Ainsi, les pompiers et les grands brûlés, qui sont les plus exposés aux HAPs, auront une forte probabilité d'absorber des toxiques au niveau de la peau qui seront reconnus par les Th22. De plus, il peut y avoir un certain niveau de combustion des différentes couches de la peau chez les grands brûlés, ce qui peut localement modifier la concentration des ligands endogènes d'AhR et affecter les Th22 en proximité. Il serait intéressant d'étudier les Th22 résidant dans l'épiderme chez les pompiers et les grands brûlés suite à une exposition aux HAPs afin d'observer la réaction de ces cellules face à des ligands exogènes et endogènes d'AhR.

Ensuite, si on étudie les différentes maladies les plus fréquemment retrouvées chez les pompiers, nous pouvons remarquer qu'elles sont souvent liées aux HAPs et touchent les sites qui sont en contact direct avec ces substances. Par exemple, les pompiers développent des cancers et des troubles respiratoires, comme l'asthme, l'hyperactivité bronchique et la maladie pulmonaire obstructive chronique (Mustajbegovic, 2001; Prezant et al., 2002; Reinisch et al., 2001). Les pompiers sont exposés à de fortes concentrations de particules et de gaz potentiellement nocifs et cancérigènes. Puisque la voie d'entrée principale dans l'organisme est par la voie respiratoire, c'est à ce niveau que les cellules sont les plus exposées à des substances toxiques. De plus, nous savons que les Th17 se retrouvent dans les muqueuses et les tissus en contact avec le milieu extérieur, dont les poumons (Rendon et al., 2012). D'ailleurs, un groupe de chercheurs avait déjà démontré que la pollution urbaine, ainsi que la fumée de cigarette et le gaz d'échappement du diesel, était capable d'exacerber les maladies des voies respiratoires en stimulant la différenciation des cellules Th17 et donc la production d'IL-17, ce qui augmente l'inflammation à ce niveau (van Voorhis et al., 2013). Puisque les particules aériennes et les gaz contiennent des HAPs, des retardateurs de flammes et d'autres ligands d'AhR, ceux-ci agissent au niveau des cellules via l'AhR pour favoriser la différenciation des Th17 (van Voorhis et al., 2013). D'après cette étude, l'exposition aérienne à des HAPs et d'autres ligands potentiels d'AhR a la capacité d'exacerber certaines maladies inflammatoires en modulant la réponse immunitaire via la différenciation des cellules, comme on l'a vu avec l'augmentation des cellules Th1 pro-inflammatoires en fonction des années d'expérience d'un pompier. Les Th17 sont aussi reconnues pour jouer un rôle important dans l'asthme en augmentant la réponse inflammatoire (Cosmi et al., 2011). Ainsi, notre démonstration de l'augmentation des Th17 et Th1 chez les pompiers concorde avec les maladies inflammatoires retrouvées dans cette population. En conclusion, la réponse des cellules immunitaires et les conséquences subséquentes sur l'organisme suite à une exposition aux HAPs et d'autres substances dans l'air restent encore à être élucidées. Ces expositions peuvent être variables, soient chroniques comme chez les pompiers ou aiguës comme chez les grands brûlés. Dépendamment du type d'intensité de l'exposition, nous pouvons supposer que les réponses physiologiques vont être différentes à cause du type et de la concentration de ligands d'AhR auxquels les cellules immunitaires sont exposées. Les substances retrouvées dans le mélange de particules et de gaz pourraient moduler les cellules T vers une réponse pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire. L'investigation sur ce sujet pourrait

contribuer aux études sur la santé publique des travailleurs qui sont en contact avec des gaz et des particules ayant potentiellement la capacité d'activer AhR. De plus, cette étude pourrait identifier les types de ligands pouvant induire la différenciation des cellules T pour favoriser soit une réponse inflammatoire ou une réponse anti-inflammatoire. Cela nous permettrait d'envisager des méthodes de thérapie chez les grands brûlés, ou chez des patients avec des maladies inflammatoires, basée sur la modulation de la réponse immune via l'AhR des cellules T d'une manière ligand-dépendante.

## BIBLIOGRAPHIE

- Alexander, M., Chaudry, I. H., & Schwacha, M. G. (2002). Relationships between burn size, immunosuppression, and macrophage hyperactivity in a murine model of thermal injury. *Cellular Immunology*, 220(1), 63–69. doi:10.1016/S0008-8749(03)00024-8
- Apetoh, L., Quintana, F. J., Pot, C., Joller, N., Xiao, S., Kumar, D., Burns, E. J., Sherr, D. H., Weiner, H. L., Kuchroo, V. K. (2010). The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nature Immunology*, 11(9), 854–861. doi:10.1038/ni.1912
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441(7090), 235–8. doi:10.1038/nature04753
- Bi, Y., & Yang, R. (2012). Direct and indirect regulatory mechanisms in TH17 cell differentiation and functions. *Scandinavian Journal of Immunology*, 75(6), 543–52. doi:10.1111/j.1365-3083.2012.02686.x
- Brown, D. J., Van Overmeire, I., Goeyens, L., Denison, M. S., De Vito, M. J., & Clark, G. C. (2004). Analysis of Ah receptor pathway activation by brominated flame retardants. *Chemosphere*, 55(11), 1509–1518. doi:10.1016/j.chemosphere.2003.10.019
- Casado, F., Singh, K., & Gasiewicz, T. (2010). The aryl hydrocarbon receptor: Regulation of hematopoiesis and involvement in the progression of blood diseases. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 44(4), 199–206. doi:10.1016/j.bcmd.2010.01.005
- Caux, C., O'Brien, C., & Viau, C. (2002). Determination of firefighter exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and benzene during fire fighting using measurement of biological indicators. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, 17(5), 379–386. doi:10.1080/10473220252864987
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(12), 1875–86. doi:10.1084/jem.20030152
- Corsini, E., & Oukka, M. (2011). Alterations in regulatory T-cells: Rediscovered pathways in immunotoxicology. *Immunotoxicology*, 8(4), 251–257. doi:10.3109/1547691X.2011.598885.Alterations

- Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E., Romagnani, S., & Annunziato, F. (2011). Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*, *66*(8), 989–98. doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02576.x
- De Heer, C., & Schuurman, H.-J. (1995). Toxicity of 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxin (TCDD) to the human thymus after implantation in SCID mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*.
- Denison, M., & Nagy, S. (2003). Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structurally Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *43*, 309–334. doi:10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828
- Djuretic, I. M., Levanon, D., Negreanu, V., Groner, Y., Rao, A., & Ansel, K. M. (2007). Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nature Immunology*, *8*(2), 145–53. doi:10.1038/ni1424
- Duan, X., Yarmush, D., Leeder, A., Yarmush, M. L., & Mitchell, R. N. (2008). Burn-induced immunosuppression: attenuated T cell signaling independent of IFN-gamma- and nitric oxide-mediated pathways. *Journal of Leukocyte Biology*, *83*(2), 305–13. doi:10.1189/jlb.0407228
- Esser, C. (2009). The immune phenotype of AhR null mouse mutants: not a simple mirror of xenobiotic receptor over-activation. *Biochemical Pharmacology*, *77*(4), 597–607. doi:10.1016/j.bcp.2008.10.002
- Esser, C., & Bargen, I. (2013). Functions of the aryl hydrocarbon receptor in the skin. *Seminars in Immunopathology*, *35*(6), 677–91. doi:10.1007/s00281-013-0394-4
- Esser, C., Rannug, A., & Stockinger, B. (2009). The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends in Immunology*, *30*(9), 447–454. doi:10.1016/j.it.2009.06.005
- Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorisio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., Durham, S. R., Schmidt-Weber, C. B., Cavani, A. (2009). Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(12), 3573–3585. doi:10.1172/JCI40202.exclusively
- Fent, K. W., Eisenberg, J., Snawder, J., Sammons, D., Pleil, J. D., Stiegel, M. a, Mueller, C., Horn, G. P., Dalton, J. (2014). Systemic Exposure to PAHs and Benzene in Firefighters Suppressing Controlled Structure Fires. *The Annals of Occupational Hygiene*, 1–16. doi:10.1093/annhyg/meu036
- Flaveny, C. A., & Perdew, G. H. (2009). Transgenic Humanized AHR Mouse Reveals Differences between Human and Mouse AHR Ligand Selectivity. *Molecular and Cellular Pharmacology*, *1*(3), 119–123.

- Fletcher, J. M., Lonergan, R., Costelloe, L., Kinsella, K., Moran, B., O'Farrelly, C., Tubridy, N., Mills, K. H. G. (2009). CD39<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *Journal of Immunology*, *183*(11), 7602–10. doi:10.4049/jimmunol.0901881
- Funatake, C., & Marshall, N. (2005). Cutting edge: activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin generates a population of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells with characteristics of. *The Journal of Immunology*, *175*(7), 4184–4188.
- Gandhi, R., Kumar, D., Burns, E., & Nadeau, M. (2010). Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nature Immunology*, *11*(9), 846–853. doi:10.1038/ni.1915
- Ganjalkhani Hakemi, M., Ghaedi, K., Andalib, A., Hosseini, M., & Rezaei, A. (2011). Optimization of human Th17 cell differentiation in vitro: evaluating different polarizing factors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, *47*(8), 581–92. doi:10.1007/s11626-011-9444-1
- Guillon, a., Le Ménach, K., Flaud, P.-M., Marchand, N., Budzinski, H., & Villenave, E. (2013). Chemical characterization and stable carbon isotopic composition of particulate Polycyclic Aromatic Hydrocarbons issued from combustion of 10 Mediterranean woods. *Atmospheric Chemistry and Physics*, *13*(5), 2703–2719. doi:10.5194/acp-13-2703-2013
- Haarmann-Stemmann, T., Bothe, H., & Abel, J. (2009). Growth factors, cytokines and their receptors as downstream targets of arylhydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways. *Biochemical Pharmacology*, *77*(4), 508–20. doi:10.1016/j.bcp.2008.09.013
- Hegazy, A. N., Peine, M., Helmstetter, C., Panse, I., Fröhlich, A., Bergthaler, A., Flatz, L., Pinschewer, D. D., Radbruch, A., Löhning, M. (2010). Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. *Immunity*, *32*(1), 116–28. doi:10.1016/j.immuni.2009.12.004
- Hirota, K., Martin, B., & Veldhoen, M. (2010). Development, regulation and functional capacities of Th17 cells. *Seminars in Immunopathology*, *32*(1), 3–16. doi:10.1007/s00281-009-0187-y
- Horiuchi, S., Onodera, A., Hosokawa, H., Watanabe, Y., Tanaka, T., Sugano, S., Suzuki, Y., Nakayama, T. (2011). Genome-wide analysis reveals unique regulation of transcription of Th2-specific genes by GATA3. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *186*(11), 6378–89. doi:10.4049/jimmunol.1100179

- Kaplan, M., Bromiker, R., & Hammerman, C. (2014). Hyperbilirubinemia, hemolysis, and increased bilirubin neurotoxicity. *Seminars in Perinatology*, 38(7), 429–437. doi:10.1053/j.semperi.2014.08.006
- Kerkvliet, N. (2002). Recent advances in understanding the mechanisms of TCDD immunotoxicity. *International Immunopharmacology*, 2, 277–291.
- Kerkvliet, N. I. (2009). AHR-mediated immunomodulation: the role of altered gene transcription. *Biochemical Pharmacology*, 77(4), 746–60. doi:10.1016/j.bcp.2008.11.021
- Kim, D. W., Gazourian, L., Quadri, S. a, Romieu-Mourez, R., Sherr, D. H., & Sonenshein, G. E. (2000). The RelA NF-kappaB subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. *Oncogene*, 19(48), 5498–506. doi:10.1038/sj.onc.1203945
- Kimura, A., & Naka, T. (2008). Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(28), 9721–9726.
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., & Osborne, B. A. (2007). *Kuby Immunology, sixth edition*. W. H. Freeman & Company.
- Klaassen, C. (2007). *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* (7th ed.). McGraw-Hill Professional.
- Kociba, R. J., & Schwetz, B. A. (1982). Toxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Drug Metabolism Reviews*, 13(3), 387–406.
- Laurence, A., Tato, C. M., Davidson, T. S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R. B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., Shevach, E. M., O'shea, J. J. (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*, 26(3), 371–81. doi:10.1016/j.immuni.2007.02.009
- Lawrence, C., & Atac, B. Hematologic changes in massive burn injury. *Critical care medicine*, 1284–1288 (1992). doi:10.1097/00003246-199209000-00015
- Lazarevic, V., Chen, X., Shim, J.-H., Hwang, E.-S., Jang, E., Bolm, A. N., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Glimcher, L. H. (2011). T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding RORγt. *Nature Immunology*, 12(1), 96–104. doi:10.1038/ni.1969
- Lexberg, M. H., Taubner, A., Förster, A., Albrecht, I., Richter, A., Kamradt, T., Radbruch, A., Chang, H.-D. (2008). Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo. *European Journal of Immunology*, 38(10), 2654–64. doi:10.1002/eji.200838541

- Littman, D. R., & Rudensky, A. Y. (2010). Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*, *140*(6), 845–58. doi:10.1016/j.cell.2010.02.021
- Liu, J., Zhang, L., Winterroth, L. C., Garcia, M., Weiman, S., Wong, J. W., Sunwoo, J. B., Nadeau, K. C. (2013). Epigenetically mediated pathogenic effects of phenanthrene on regulatory T cells. *Journal of Toxicology*, *2013*, 967029. doi:10.1155/2013/967029
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4<sup>+</sup>T cells: differentiation and functions. *Clinical & Developmental Immunology*, *2012*, 925135. doi:10.1155/2012/925135
- Mannick, J. a, Rodrick, M. L., & Lederer, J. a. (2001). The immunologic response to injury. *Journal of the American College of Surgeons*, *193*(3), 237–44.
- Marshall, N. B., & Kerkvliet, N. I. (2010). Dioxin and immune regulation: emerging role of aryl hydrocarbon receptor in the generation of regulatory T cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1183*, 25–37.
- Marshall, N., Vorachek, W., Steppan, L. B., Mourich, D. V, & Kerkvliet, N. I. (2008). Functional characterization and gene expression analysis of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells generated in mice treated with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *The Journal of Immunology*, *181*, 2382–2391.
- McAler, J. P., & Kolls, J. K. (2011). Mechanisms controlling Th17 cytokine expression and host defense. *Journal of Leukocyte Biology*, *90*(2), 263–70. doi:10.1189/jlb.0211099
- Mestas, J., & Hughes, C. C. W. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *Journal of Immunology*, *172*(5), 2731–2738. doi:10.4049/jimmunol.172.5.2731
- Miossec, P., & Kolls, J. K. (2012). Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *11*(10), 763–76. doi:10.1038/nrd3794
- Muranski, P., & Restifo, N. P. (2013). Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood*, *121*(13), 2402–14. doi:10.1182/blood-2012-09-378653
- Mustajbegovic, J. (2001). Respiratory function in active firefighters. *American Journal of Industrial Medicine*, *62*, 55–62.
- Nguyen, L. P. L., & Bradfield, C. A. C. (2007). The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chemical Research in Toxicology*, *21*(1), 102–116. doi:10.1021/tx7001965

- Nguyen, N., & Hanieh, H. (2013). The roles of aryl hydrocarbon receptor in immune responses. *International Immunology*, *25*(6), 335–43. doi:10.1093/intimm/dxt011
- O'sullivan, S., & O'Connor, T. (1997). Immunosuppression following thermal injury : the pathogenesis of immunodysfunction. *British Journal of Plastic Surgery*, *50*, 615–623.
- Orman, M. a, Nguyen, T. T., Ierapetritou, M. G., Berthiaume, F., & Androulakis, I. P. (2011). Comparison of the cytokine and chemokine dynamics of the early inflammatory response in models of burn injury and infection. *Cytokine*, *55*(3), 362–71. doi:10.1016/j.cyto.2011.05.010
- Pileri, D., Accardo Palombo, a, D'Amelio, L., D'Arpa, N., Amato, G., Masellis, a, Cataldo, V., Mogavero, R., Napoli, B., Lombardo, C., Conte, C. (2008). Concentrations of cytokines IL-6 and IL-10 in plasma of burn patients: their relationship to sepsis and outcome. *Annals of Burns and Fire Disasters*, *21*(4), 182–5.
- Pinel-Marie, M.-L., Louarn, L., Desmots, S., Fardel, O., & Sparfel, L. (2011). Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of the IgA receptor FcαRI by the environmental contaminant benzo(a)pyrene in human macrophages. *Toxicology*, *290*(1), 89–95. doi:10.1016/j.tox.2011.08.018
- Prezant, D., & Weiden, M. (2002). Cough and bronchial responsiveness in firefighters at the World Trade Center site. *England Journal of Medicine*, *347*(11).
- Quintana, F. (2013). Regulation of central nervous system autoimmunity by the aryl hydrocarbon receptor. *Seminars in Immunopathology*, *35*(6), 627–35. doi:10.1007/s00281-013-0397-1
- Quintana, F. J., Basso, A. S., Iglesias, A. H., Korn, T., Farez, M. F., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., Weiner, H. L. (2008). Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, *453*(7191), 65–71. doi:10.1038/nature06880
- Ramirez, J.-M., Brembilla, N. C., Sorg, O., Chicheportiche, R., Matthes, T., Dayer, J.-M., Saurat, J.-H., Roosnek, E., Chizzolini, C. (2010). Activation of the aryl hydrocarbon receptor reveals distinct requirements for IL-22 and IL-17 production by human T helper cells. *European Journal of Immunology*, *40*(9), 2450–9. doi:10.1002/eji.201040461
- Reinisch, F., Harrison, R. J., Cussler, S., Athanasoulis, M., Balmes, J., Blanc, P., & Cone, J. (2001). Physician reports of work-related asthma in California, 1993-1996. *American Journal of Industrial Medicine*, *39*(1), 72–83.

- Rendon, J. L., & Choudhry, M. a. (2012). Th17 cells: critical mediators of host responses to burn injury and sepsis. *Journal of Leukocyte Biology*, 92(3), 529–38. doi:10.1189/jlb.0212083
- Sallusto, F., Zielinski, C. E., & Lanzavecchia, A. (2012). Human Th17 subsets. *European Journal of Immunology*, 42(9), 2215–20. doi:10.1002/eji.201242741
- Schwacha, M. G. (2009). Gammadelta T-cells: potential regulators of the post-burn inflammatory response. *Burns : Journal of the International Society for Burn Injuries*, 35(3), 318–26. doi:10.1016/j.burns.2008.08.002
- Simoneit, B. R. (2002). *Biomass burning — a review of organic tracers for smoke from incomplete combustion*. *Applied Geochemistry* (Vol. 17). doi:10.1016/S0883-2927(01)00061-0
- Singh, N. P., Singh, U. P., Singh, B., Price, R. L., Nagarkatti, M., & Nagarkatti, P. S. (2011). Activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) leads to reciprocal epigenetic regulation of FoxP3 and IL-17 expression and amelioration of experimental colitis. *PloS One*, 6(8), e23522. doi:10.1371/journal.pone.0023522
- Smith, K., Murray, I., & Tanos, R. (2011). Identification of a high-affinity ligand that exhibits complete aryl hydrocarbon receptor antagonism. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 338(1), 318–327. doi:10.1124/jpet.110.178392.
- Stevens, E., Mezrich, J., & Bradfield, C. (2009). The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology*, 127(3), 299–311. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03054.x
- Tian, Y. (2009). Ah receptor and NF-kappaB interplay on the stage of epigenome. *Biochemical Pharmacology*, 77(4), 670–80. doi:10.1016/j.bcp.2008.10.023
- Tian, Y., Rabson, A. B., & Gallo, M. a. (2002). Ah receptor and NF-kappaB interactions: mechanisms and physiological implications. *Chemico-Biological Interactions*, 141(1-2), 97–115.
- Uno, S., & Makishima, M. (2009). Benzo[a]pyrene Toxicity and Inflammatory Disease. *Current Rheumatology Reviews*, 5(4), 266–271. doi:10.2174/157339709790192549
- Van Voorhis, M., Fechner, J. J. H., Zhang, X., Mezrich, J. J. D., & Voorhis, M. Van. (2013). The Aryl Hydrocarbon Receptor: A Novel Target for Immunomodulation in Organ Transplantation. *Transplantation*, 95(8), 983–90. doi:10.1097/TP.0b013e31827a3d1d
- Van Voorhis, M., Knopp, S., Julliard, W., Fechner, J. H., Zhang, X., Schauer, J. J., & Mezrich, J. D. (2013). Exposure to atmospheric particulate matter enhances Th17

polarization through the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS One*, 8(12), e82545.  
doi:10.1371/journal.pone.0082545

- Veldhoen, M., & Duarte, J. (2010). The aryl hydrocarbon receptor: fine-tuning the immune-response. *Current Opinion in Immunology*, 22(6), 747–52.  
doi:10.1016/j.coi.2010.09.001
- Veldhoen, M., Hirota, K., & Westendorp, A. (2008). The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*, 453(7191), 106–109. doi:10.1038/nature06881
- Vogel, C. F. a, & Matsumura, F. (2009). A new cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and RelB, a member of the NF-kappaB family. *Biochemical Pharmacology*, 77(4), 734–45. doi:10.1016/j.bcp.2008.09.036
- Vos, J. G., De Heer, C., & Van Loveren, H. (1997). Immunotoxic effects of TCDD and toxic equivalency factors. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis*, 17(4-5), 275–284. doi:10.1002/(SICI)1520-6866(1997)17: 4/5<275::AID-TCM10>3.0.CO;2-B
- Weaver, C. T., & Hatton, R. D. (2009). Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. *Nature Reviews. Immunology*, 9(12), 883–9. doi:10.1038/nri2660
- Yamada, Y., Endo, S., & Inada, K. (1996). Plasma cytokine levels in patients with severe burn injury-with reference to the relationship between infection and prognosis. *Burns*, 22(8), 587–593.
- Yamaguchi, T., Wing, J. B., & Sakaguchi, S. (2011). Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Seminars in Immunology*, 23(6), 424–30. doi:10.1016/j.smim.2011.10.002
- Yang, L., Anderson, D. E., Baecher-Allan, C., Hastings, W. D., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Hafler, D. A. (2008). IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature*, 454(7202), 350–2. doi:10.1038/nature07021
- Yeh, F. L., Lin, W. L., Shen, H. D., & Fang, R. H. (1999). Changes in circulating levels of interleukin 6 in burned patients. *Burns : Journal of the International Society for Burn Injuries*, 25(2), 131–6.
- Yeh, F. L., Lin, W. L. W., Shen, H. D., & Fang, R. H. (1997). Changes in serum tumour necrosis factor-alpha in burned patients. *Burns*, 23(718), 6–10.

- Zhang, N., Pan, H. F., & Ye, D. Q. (2011). Th22 in inflammatory and autoimmune disease: Prospects for therapeutic intervention. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 353, 41–46. doi:10.1007/s11010-011-0772-y
- Zhou, L., Chong, M. M. W., & Littman, D. R. (2009). Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*, 30(5), 646–55. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.001
- Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., Guo, L., & Paul, W. E. (2006). GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Research*, 16(1), 3–10. doi:10.1038/sj.cr.7310002