

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

**Régulation des effets des glucocorticoïdes sur les  
lymphocytes T lors de la brûlure sévère**

Par  
Michele D'Elia

Thèse présentée  
pour l'obtention  
du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)  
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury  
et examinateur interne

Denis Girard  
INRS-Institut Armand-Frappier

Examinateur externe

Dominique R. Garrel  
Université de Montréal-CHUM

Examinateur externe

Michel J. Tremblay  
Université Laval-CHUL

Directeur de recherche

Jacques Bernier  
INRS-Institut Armand-Frappier



## Résumé

---

Le temps d'hospitalisation ainsi que le pronostic de survie des patients gravement brûlés est grandement influencé par la sévérité de la brûlure, son étendue et les soins apportés par le personnel hospitalier. Une meilleure compréhension des conséquences physiologiques de la brûlure chez les patients revêt une importance particulière puisque c'est à partir de ces travaux de recherche que des traitements plus appropriés seront prodigués. Une brûlure grave est en fait l'agression la plus intense que le corps humain peut subir. Au-delà des blessures cutanées, il y a les organes vitaux qui sont en hyper-réaction. Les grands-brûlés sont des polytraumatisés faisant face à plusieurs conséquences médicales graves : perte de masse musculaire importante, ce qui diminue la capacité de se rétablir, perte d'eau importante, risque d'infection majeure au niveau du sang (septicémie) causée par la perte de la peau et la perméabilité accrue de la barrière gastro-intestinale, déstabilisation des fonctions vitales, accumulation des déchets cellulaires causée par le stress oxydatif et une dysfonction généralisée du système immunitaire.

De nombreuses études portant sur la brûlure ont démontré l'effet négatif sur le système immunitaire de divers médiateurs solubles. On compte parmi ces facteurs immunosuppresseurs : les cytokines pro-inflammatoires, les prostaglandines E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), l'oxyde nitrique (NO), les hormones de stress. La sécrétion massive d'hormones de stress tels les catécholamines et les glucocorticoïdes (GC) est une adaptation de l'organisme à la brûlure sévère. Le cortisol (Cort) est le principal GC et exerce plusieurs rôles tels que : le catabolisme des graisses et des protéines, le contrôle de la glycémie et de la réponse immunitaire. Dans les premières 24 à 72 heures suivant la brûlure, la sécrétion d'hormones de stress est maximale et sert à contrôler la réponse inflammatoire et à empêcher l'apparition du syndrome de la réponse inflammatoire systémique (SRIS) chez les grands-brûlés.

Les lymphocytes T sont des cellules particulièrement sensibles à l'action des hormones de stress. Leurs fonctions sont déprimées chez les grands-brûlés. Des nombreuses études menées soient à partir du sang de patients gravement brûlés ou sur des modèles animaux ont démontré l'influence négative des GC sur le développement et les fonctions des

lymphocytes T. La manifestation le plus spectaculaire de l'action des GC sur le développement des lymphocytes T a été démontrée en laboratoire à partir de divers modèles. Les GC sécrétés suite à la brûlure causent l'apoptose massive des thymocytes entraînant à leur tour une atrophie du thymus visible au jour 1 post-brûlure. Le stress oxydatif est un autre facteur qui vient influencer les fonctions des lymphocytes T. La balance intracellulaire entre molécules anti- et pro-oxydantes permet l'activation adéquate et la prolifération de ces cellules. La brûlure sévère crée un déséquilibre et favorise l'accumulation de radicaux libres. Des nombreuses études en ont fait état comme une cause d'immunosuppression.

Le but de ce travail était de vérifier la régulation des effets des GC sur les lymphocytes T lors de la brûlure sévère. Dans un premier temps, nous voulions identifier les mécanismes responsables de la sensibilité des thymocytes aux GC sécrétés dans les premières heures suivant la brûlure. Dans un deuxième temps, nous voulions évaluer la sensibilité aux GC et au stress oxydatif des lymphocytes T retrouvés en périphérie au jour 10 post-brûlure.

Dans le premier volet de cette recherche nous avons démontré que la brûlure sévère augmente les niveaux du récepteur à GC (GR) et induit l'expression de l'enzyme 11beta-hydroxystéroïdes déshydrogénase de type 1 (11 $\beta$ -HSD1) au niveau des thymocytes. De plus, nous démontrons que l'expression de la 11 $\beta$ -HSD1 rend les thymocytes plus sensibles aux hormones de stress en augmentant le pool intracellulaire GC actifs. *In vitro*, nous avons observé que l'exposition de thymocytes aux cytokines pro-inflammatoires telles interleukine (IL)-1 $\beta$ , l'IL-6 et le *tumor necrosis factor* (TNF)- $\alpha$  augmentait la conversion de GC inactifs en GC actifs entraînant ainsi leur apoptose. En résumé, ces résultats montrent que l'atrophie thymique visible au jour 1 post-brûlure est causée par l'augmentation des niveaux plasmatiques de GC, de l'expression du GR et de la 11 $\beta$ -HSD1 chez les thymocytes. Ces trois facteurs sont responsables de l'augmentation de la sensibilité des thymocytes aux GC.

Dans un deuxième volet, nos études se sont portées au jour 10 post-brûlure où nous voulions vérifier ce qu'il advenait de la sensibilité des lymphocytes T périphériques aux

GC et au stress oxydatif. Jusqu'à présent, aucun travail de recherche n'avait été effectué en ce sens. La première étape fut de vérifier comment le stress oxydatif influence les fonctions des lymphocytes T de souris brûlées. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle de culture cellulaire *ex vivo*. De nombreuses études utilisant ce même modèle ont montré une dysfonction des lymphocytes T au jour 10 post-brûlure. En culture cellulaire, l'ajout de 2-mercaptopropanoïde (2-ME) au milieu permet de diminuer le stress oxydatif du milieu extracellulaire et stimule la prolifération des lymphocytes T. Le 2-ME permet l'entrée de cystéine dans ces cellules. Cet acide aminé est essentiel pour les lymphocytes T. *In vivo*, la cystéine est livrée aux lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) lors de la présentation antigénique. *In vitro*, lorsque ces cellules sont cultivées sans CPA elles ne peuvent proliférer, d'où l'utilité de l'ajout 2-ME. Notre modèle consistait à vérifier la prolifération *in vitro* de cellules T isolées de souris brûlées/témoins dans un milieu de culture avec et sans 2-ME, ce qui recréait un micro-environnement réducteur ou oxydatif. À notre grande surprise, nous avons observé la prolifération de lymphocytes T de souris brûlées même dans un milieu exempt de 2-ME. Ceci nous a amené à identifier le mécanisme responsable de cette prolifération. Nous avons découvert un système de transport exprimé à la surface des lymphocytes T de souris brûlées qui permettait d'augmenter la concentration intracellulaire en cystéine et favorisait leur prolifération.

La seconde étape fut de vérifier dans ces mêmes conditions de culture la sensibilité aux GC des lymphocytes T de souris brûlées. Nous avons observé que ces cellules sont moins sensibles à l'apoptose induite par les GC et réfractaires à leur action anti-proliférative. Cette résistance semble passer par la phosphorylation de la protéine p38 *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK). L'inhibition de la phosphorylation de cette protéine chez les lymphocytes T de souris brûlées tend à normaliser la production d'IL-2 et d'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), deux cytokines fortement produites suivant leur activation.

En résumé, ces travaux de recherches démontrent que la génération intracellulaire de GC actifs est un mécanisme important modifiant la sensibilité des thymocytes aux hormones de stress. Aussi, nous montrons que la sensibilité aux GC est variable en fonction du

temps post-brûlure et de la nature des cellules puisqu'au jour 10, les lymphocytes T périphériques ont développé une certaine résistance aux hormones de stress. Qui plus est, les fonctions de ces cellules ne sont plus limitées par les besoins en cystéine, puisqu'elles ont trouvé un moyen d'assurer son importation via l'expression d'un système de transport spécifique.

---

Michele D'Elia  
Étudiant

---

Dr. Jacques Bernier  
Directeur de recherche



## Remerciements

---

Quelques années se sont écoulées depuis la fin de ma maîtrise. Ces années furent investies dans des études doctorales à travers lesquelles j'ai pu affirmer ce qui sommeillait depuis mes premières lectures à la bibliothèque de mon école primaire, l'âme du scientifique est bel et bien vivante chez moi. Tout jeune, je fus attiré par les phénomènes de la vie, comprendre ce qui nous entoure, expliquer pourquoi les événements se produisent ainsi. On ne sait trop ce qui façonne les intérêts des gens, peut-être qu'il suffit d'expérimenter, de connaître, de pratiquer de nombreuses activités pour définir un peu ce qui nous intéresse. Je ne suis pas de ceux qui espéraient devenir un scientifique, c'est toujours un peu dans le doute que j'ai choisi de poursuivre mes études de niveau en niveau, de diplôme en diplôme dans une discipline scientifique, de plus en plus précise, de plus en plus spécialisée. Ce qui n'a jamais fait de doute c'est qu'il est bien plus facile d'orienter sa vie dans un domaine qui nous intéresse, et en recherche comme dans n'importe quel autre domaine, je considère que c'est la passion qui permet au chercheur d'avancer, d'espérer le résultat qui fera la différence, de toujours voir le côté positif malgré les déceptions trop nombreuses.

En fait, ce n'est qu'à la suite des mes études de maîtrise que j'ai senti que j'étais à ma place. Cette place, c'est celle que je voudrai occuper dans le futur où ce sera à mon tour de faire avancer les limites de la connaissance, de transmettre cette connaissance à des étudiants qui, comme moi, seront un peu à la recherche d'eux-mêmes, d'une place dans la société. J'aimerais profiter de l'occasion pour remercier les gens qui m'ont soit aidé à devenir qui je suis aujourd'hui, soit rendu mon passage à l'institut unique, ces gens que j'ai eu le plaisir de faire la connaissance et certains qui font aujourd'hui parti de mes amis.

Premièrement, ce sont mes parents que je remercie, à travers ce qu'ils sont, ils m'ont légué les deux qualités les plus importantes d'un chercheur, mon père m'a rendu curieux et ma mère m'a transmis la passion. Mon frère et ma sœur pour leur support. Deuxièmement, j'aimerais souligner l'importance de mon superviseur de recherche, le Dr

Jacques Bernier, dans mon développement scientifique. C'est avec lui que j'ai débuté ma carrière en laboratoire, c'est lui qui m'a montré à toujours prendre ce qu'il y a de positif dans une situation même si elle semble mener nulle part. Il m'a donné la latitude d'établir mes hypothèses, d'expérimenter en prenant soin toutefois d'échafauder un plan de travail valable, à donner une direction à mes recherches. Bref, il m'a rendu responsable de mes actes, ce qui fut pour moi, une grande marque de confiance.

J'aimerais remercier mes collègues de laboratoire, Julie, Geneviève et Charles qui ont rendu mon quotidien si agréable. Plus particulièrement Julie, avec qui j'ai eu l'occasion de partager de nombreuses expériences et quelques nuits au laboratoire, son sens de l'organisation m'aura sauvé à des nombreuses reprises.

Un merci particulier à Claudine, Johanna, Michelle, Stéphane, Philippe et Martin que j'ai connu à l'institut et qui ont partagé non seulement ma vie scientifique, mais aussi ma vie personnelle. Ces relations se sont transformées en des amitiés qui, je l'espère, m'accompagneront pour le restant de mon existence.

Un doctorat c'est l'achèvement d'un grand projet, quelques réussites qui en valent toutes la peine et qui permettent d'oublier les nombreux échecs, ce fut l'étape de ma vie où je me suis découvert, où j'ai réalisé ce qu'il me fallait pour être heureux. Je me souhaite d'être toujours aussi passionné par la recherche, de rencontrer la femme qui partagera avec moi ces moments de joies et de peines et de réussir à la fois ma carrière scientifique et ma vie personnelle.

*« On fait la science avec des faits, comme on fait une maison avec des pierres : mais une accumulation de faits n'est pas plus une science qu'un tas de pierres n'est une maison »*

**Jules Henri Poincaré (1854-1912)**  
**Homme de science français**



## Table des matières

---

RÉSUMÉ.....	iii
REMERCIEMENTS .....	viii
TABLE DES MATIERES.....	xi
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES ABREVIATIONS .....	xv
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1. LES LYMPHOCYTES T .....	5
1.1 La maturation des thymocytes.....	5
1.2 Les lymphocytes T matures .....	9
1.2.1 Les sous-types de lymphocytes T auxiliaires matures.....	11
1.2.2 Différentiation des cellules T naïves en types Th1 vs Th2.....	13
2. LES CORTICOSTEROÏDES/GLUCOCORTICOÏDES/HORMONES DE STRESS.....	14
2.1 Découverte du cortisol .....	15
2.2 Caractéristiques des corticostéroïdes .....	15
2.2.1 Production systémique : axe Hypothalamo-Hypophysaire-Surrénalien .....	17
2.2.1.1 Mécanismes de régulation.....	18
2.2.2 Production locale : $11\beta$ -Hydroxystéroïde déshydrogénase ( $11\beta$ -HSD) .....	20
2.2.2.1 $11\beta$ -HSD1 .....	21
2.2.2.2 $11\beta$ -HSD2.....	21
2.2.2.3 Expression et rôle de la $11\beta$ -HSD1 au niveau des cellules du système immunitaire .....	21
2.2.2.4 Régulation de l'expression de la $11\beta$ -HSD1 par les médiateurs de l'inflammation .....	23
2.3 Le récepteur à glucocorticoïdes (GR) .....	23
2.3.1 Isoformes du GR .....	24
2.3.1.1 Structure du récepteur .....	25
2.3.1.2 Complexe transcriptionnel du GR.....	26
2.3.2 Transcription des gènes sous l'influence des GC .....	27
2.3.2.1 Mécanismes de répression de la transcription des gènes par le GR .....	28
2.3.2.1.1 Transrépression.....	29
2.3.2.1.2 Recrutement de protéines HDACs.....	30
2.3.2.1.3 Induction de gènes répresseurs .....	30
2.4 Effets biologiques des glucocorticoïdes .....	32
2.4.1 Effets physiologiques .....	32
2.4.2 Effets sur les cellules du système immunitaire.....	32
2.4.2.1 Thymocytes.....	33
2.4.2.2 Lymphocytes T .....	37
2.4.2.3 Autres cellules .....	41
3.LE PHENOMENE DE RESISTANCE AUX GLUCOCORTICOÏDES.....	42
3.1 Mécanismes de résistance.....	43
3.1.1 Activité cellulaire .....	43
3.1.2 Phosphorylation du récepteur via les MAPkinases .....	44
3.1.3 HDAC-2.....	45
3.1.4 Compétition avec GR $\beta$ .....	46
3.1.5 Influence du facteur inhibiteur de migration (MIF) .....	47

4. LE STRESS OXYDATIF .....	49
4.1 Effets sur les lymphocytes T .....	49
4.2 Mécanismes anti-oxydants .....	50
4.2.1 Glutathion .....	50
4.2.1.1 Structure et synthèse .....	51
4.2.1.2 Rôle au niveau des lymphocytes T .....	51
4.2.3 Transport des acides aminés .....	55
4.3.1 Système $x_c$ -.....	56
4.3.1.1 xCT .....	57
4.3.1.1.1 Structure .....	58
4.3.1.1.2 Distribution .....	59
4.3.1.1.3 Gène et régulation de l'expression.....	59
4.3.1.2 CD98.....	60
4.3.1.2.1 Structure .....	61
4.3.1.2.2 Gène et régulation de l'expression.....	61
4.3.1.2.3 Fonctions au niveau des lymphocytes T .....	62
4.4 Besoins anti-oxydants des lymphocytes T .....	63
4.4.1 <i>In Vivo</i> .....	63
4.4.2 <i>In Vitro</i> – Rôle du 2-Mercaptoethanol.....	65
5. LE TRAUMATISME DE LA BRULURE .....	68
5.1 Changements physiologiques.....	69
5.2 La réponse associée aux hormones de stress.....	72
5.3 La réponse associée au stress oxydatif.....	74
5.3.1 Thérapie anti-oxydante post-lésion thermique .....	74
5.4 Impacts de la brûlure sévère sur les lymphocytes T .....	78
CHAPITRE 2 : OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE .....	83
CHAPITRE 3 : ARTICLE I .....	88
Mise en contexte .....	89
Résumé français .....	91
Contributions des auteurs .....	93
<i>Regulation of glucocorticoid sensitivity in thymocytes from burn-injured mice</i> .....	94
CHAPITRE 4 : ARTICLE II .....	103
Mise en contexte .....	104
Résumé français .....	106
Contributions des auteurs .....	108
<i>Burn injury induces the expression of cystine/glutamate transporter <math>x_c</math> in mouse T cells</i> .....	109
CHAPITRE 5 : ARTICLE III .....	143
Mise en contexte .....	144
Résumé français .....	147
Contributions des auteurs .....	149
<i>p38 MAPK activity in splenic T cells is responsible for glucocorticoid resistance observed in thermally-injured mice</i> .....	150
CHAPITRE 6 : DISCUSSION ET CONCLUSION .....	193
BIBLIOGRAPHIE .....	208

**Liste des figures et des tableaux**

---

- Figure 1.....** Représentation des étapes principales menant à la maturation des thymocytes
- Figure 2.....** Principales protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire résultant de la liaison du TcR à la surface du lymphocyte T
- Figure 3.....** Sous-types de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> matures
- Figure 4.....** Différentiation des lymphocytes T en type Th1 ou Th2
- Figure 5.....** Structure chimique du cortisol
- Figure 6.....** Schéma des étapes et des enzymes stéroïdogéniques impliquées dans la synthèse du corticostérone/cortisol
- Figure 7.....** Axe Hypothalamo-Hypophysaire-Surrénalien
- Figure 8.....** Interconversion des GC par les enzymes 11 $\beta$ -HSD
- Figure 9.....** Structure du récepteur à glucocorticoïdes humain
- Figure 10.....** Complexe transcriptionnel du récepteur à glucocorticoïdes
- Figure 11.....** Mécanismes de répression de la transcription des gènes par le GR
- Figure 12.....** Concept d'antagonisme mutuel expliquant la sélection positive des thymocytes
- Figure 13.....** Rôle de HDAC-2 dans la perte de sensibilité aux glucocorticoïdes
- Figure 14.....** Mécanisme d'action de MIF au niveau cellulaire et son rôle dans la résistance aux GC
- Figure 15.....** Effet de la balance intracellulaire en GSH chez les APC sur la différentiation des cellules T naïves en cellules de types Th1 ou Th2
- Figure 16.....** Structure du système x<sub>c</sub>- exprimé à la membrane cellulaire
- Figure 17.....** La sécrétion de cystéine par les CPA activées crée un micro-environnement réducteur dans la jonction immunitaire et favorise la prolifération des lymphocytes T

**Figure 18.....** Structure de la cystine

**Figure 19.....** Le 2-ME ajouté au milieu de culture permet la prolifération des lymphocytes T isolés via la formation de dimères mixtes 2ME-cystéine

**Figure 20.....** Modèle de la réponse inflammatoire post-trauma

**Figure 21.....** Modèle hypothétique des événements entraînant l'atrophie thymique post-brûlure

**Figure 22.....** Modèle hypothétique représentant au jour 10 post-brûlure l'augmentation du pool intracellulaire en cystéine qui favorise l'activité des cellules T CD4<sup>+</sup> et leur résistance aux GC.

**Figure 23.....** Schéma de la réponse inflammatoire et des niveaux de GC dans l'organisme suivant une brûlure sévère

---

**Tableau 1.....** Gènes reliés à l'inflammation sensibles à l'action des GC

**Tableau 2.....** Études ayant pour objet le rôle des GC dans le développement des thymocytes

**Tableau 3.....** Description des différents effets causés par les GC sur les principaux effecteurs de l'immunité

**Tableau 4.....** Principales conséquences physiologiques observées chez les grands-brûlés

**Tableau 5.....** Conséquences physiologiques des thérapies anti-oxydantes administrées aux grands-brûlés

**Tableau 6.....** Principales dysfonctions des lymphocytes T lors de la brûlure sévère

## Liste des abréviations

---

2-ME	2-mercaptopropanoïde
11 $\beta$ -HSD	11beta-hydroxystéroïde déshydrogénase
ACTH	hormone corticotropine (adrenocorticotrophin hormone)
Ag	antigène
AICD	<i>activation-induced cell death</i>
ARNm	acide ribonucléique messager
BSO	l-butathione sulfoximide
CARS	syndrome de la réponse anti-inflammatoire ( <i>compensatory anti-inflammatory response syndrome</i> )
CD	classes de différenciation ( <i>clusters of differentiation</i> )
CD25	chaîne $\alpha$ du récepteur de l'IL-2 (IL-2R $\alpha$ )
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
Con-A	concanavalin-A
Cort	cortisol/corticosterone
Cox-2	cyclooxygénase-2
CPA	cellules présentatrice d'antigènes
CRH	hormone stimulant la libération de corticotropine ( <i>corticotrophin-releasing hormone</i> )
DC	cellules dendritiques ( <i>dendritic cells</i> )
DEM	diéthylmaléate
DHC	dehydrocorticosterone
DN	thymocytes double-négatifs
DP	thymocytes double-positifs
EGR	<i>early growth response</i>
EpRE	élément de réponse électrophile
ERK	kinase contrôlée par des signaux extracellulaires ( <i>extracellular signal-regulated kinase</i> )

FasL	ligand pour Fas
GA	acide glycyrrhétinique
GC	glucocorticoïdes
GM-CSF	facteur stimulant de colonies des granulocytes/macrophages
GR	récepteur à glucocorticoïdes ( <i>glucocorticoid receptor</i> )
GRE	élément de réponse aux glucocorticoïdes
GSG	glutathion
HAT	histone acétyltransferase
HDAC	histone déacétylase
HPA	axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien ( <i>hypothalamic pituitary adrenal axis</i> )
HSF	facteur stimulant des hépatocytes
HSP	protéines de choc thermique
ICAM	molécule d'adhésion intercellulaire ( <i>intercellular adhesion molecule</i> )
IFN- $\gamma$	interféron- $\gamma$
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
IL-2R	récepteur de l'IL-2
iNOS	enzyme inductible NO synthétase
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motifs</i>
Jak	janus kinase
JNK	c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase
kDa	kilodalton
MAPK	protéine kinase activée par des agents mitogènes ( <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
MPOC	maladie pulmonaire obstructive chronique
MODS	syndrome de dysfonction multiple d'organes ( <i>multiple organ dysfunction syndrome</i> )
MR	récepteur aux minéralocorticoïdes
NAC	<i>N</i> -acétylcystéine

NFAT	facteur nucléaire des cellules T activées ( <i>nuclear factor of activated T cells</i> )
NF-κB	facteur nucléaire kappaB ( <i>nuclear factor kappaB</i> )
nGRE	élément négatif de réponse aux glucocorticoïdes
NK	tueuse naturelle ( <i>natural killer</i> )
NO	oxyde nitrique ( <i>nitric oxide</i> )
PBMC	cellules mononucléées du sang périphérique ( <i>peripheral blood mononucleated cells</i> )
PHA	phytohémaglutinine
POMC	pro-opiomelanocortine
PGE <sub>2</sub>	prostaglandine E <sub>2</sub>
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	protéine kinase C
PLA2	phospholipase A2
PMA	phorbol myristate acétate
ROS	radicaux libres ( <i>reactive oxygen species</i> )
RU-486	Mifepristone
SASP	sulfasalazine
sIL-2R	récepteur soluble de l'IL-2
SOD	superoxyde dismutase
SP	thymocytes simple-positifs
SRE	élément de réponse des stéroïdes ( <i>steroid response element</i> )
SRIS	syndrome de la réponse inflammatoire systémique
STAT	transducteur du signal et activateur de la transcription ( <i>signal transducer and activator of transcription</i> )
TcR	récepteur antigénique des cellules T
Th	lymphocyte T auxiliaire ( <i>T helper</i> )
TGF-β	facteur de croissance transformant-β ( <i>transforming growth factor-β</i> )
TLR	récepteur semblable au récepteur Toll des drosophiles ( <i>toll-like receptor</i> )
TNF-α	facteur onconécrosant-α ( <i>tumor necrosis factor-α</i> )

## Introduction

---

Une des principales conséquences de la brûlure sévère est une dysfonction généralisée du système immunitaire. Cette immunosuppression augmente le risque d'infections, le temps d'hospitalisation et la mortalité des grands-brûlés. Parmi les principaux facteurs immunosuppresseurs qui ont été associés à la brûlure sévère le stress oxydatif et les GC exercent une influence sur le développement et les fonctions des lymphocytes T.

Le stress oxydatif est relié à la synthèse et à la libération par les cellules endothéliales, les macrophages et les neutrophiles de médiateurs de l'inflammation tels le NO, le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et les radicaux libres ( $O_2^-$ ,  $HO_2^-$ ). Ces molécules oxydantes permettent à l'organisme d'attaquer directement les bactéries ou de les combattre à travers un processus pro-inflammatoire qui s'accompagne par la production massive de cytokines de ce type telles l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-6. Par ailleurs, l'activation des cellules augmente la synthèse intracellulaire de radicaux libres, qui sont pour ainsi dire, des déchets métaboliques. Le glutathion (GSH) est la principale molécule anti-oxydante synthétisée par les lymphocytes T pour contrer l'accumulation des radicaux libres. C'est un tripeptide formé des acides-aminés glutamate, glycine et cystéine. Ce dernier est le plus important, car les lymphocytes T ne peuvent l'importer. *In vivo*, ce sont les CPA qui fournissent aux cellules T la cystéine qui leur est indispensable; *in vitro*, une supplémentation du milieu de culture en 2-ME permet de palier au problème. Une des principales conséquences de la brûlure est un déficit en acide aminés, une forte activation cellulaire et la chute des niveaux de GSH, ce qui entraîne une dysfonction au niveau des lymphocytes T.

Les GC synthétisés massivement en réponse au traumatisme de la brûlure exercent une influence spectaculaire sur la viabilité des thymocytes. En effet, près de 50 % de ces cellules entrent en apoptose dans les premières 24 à 48 heures suivant la brûlure sévère, entraînant l'atrophie de l'organe. La quasi-totalité des GC sont synthétisés par les glandes surrénales suite à l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien (axe HPA). Par ailleurs, certaines cellules augmentent leur niveau intracellulaire de GC actifs via

l'expression de l'enzyme 11 $\beta$ -HSD1. Récemment, la présence de cette enzyme a été démontrée chez les thymocytes et lymphocytes T. L'activation des lymphocytes T les rend moins sensibles à l'apoptose induite par les GC. Par ailleurs, certaines fonctions des lymphocytes T matures sont influencées par les GC. En effet, ces hormones modifient le patron de synthèse des cytokines en diminuant la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  et en favorisant celle d'IL-4 et d'IL-10. Une forte activation des cellules T peut même mener à un phénomène de résistance aux GC impliquant divers éléments de signalisation intracellulaire, parmi ceux-ci, les MAPKs. Une baisse de la sensibilité aux GC chez les lymphocytes T a été observée dans diverses maladies inflammatoires telles l'arthrite rhumatoïde, la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) et l'asthme.

Les buts de ce travail sont multiples. Dans un premier temps, nous voulions identifier les mécanismes responsables de l'hypersensibilité des thymocytes aux GC au jour 1 post-brûlure. Dans un deuxième temps, nous cherchions à vérifier le niveau de sensibilité des lymphocytes T périphériques au stress oxydatif et aux GC au jour 10 post-brûlure.

Ce document est divisé en plusieurs chapitres. Le premier chapitre est une revue des connaissances actuelles sur les lymphocytes T, les GC et le stress oxydatif. Nous soulignerons les facteurs responsables de la sensibilité des lymphocytes T aux GC. Aussi, nous analyserons la réponse immunitaire chez les grands-brûlés en mettant l'emphase sur les principales dysfonctions. Par la suite, nous nous intéresserons aux conséquences physiologiques du traumatisme de la brûlure, plus particulièrement celles associées au stress oxydatif et aux GC. Finalement, nous analyserons comment les thymocytes et les lymphocytes T s'adaptent à la brûlure sévère en fonction de leur exposition au stress oxydatif et aux GC. Le second chapitre présentera les objectifs spécifiques du projet de recherche. Les résultats obtenus lors de mon doctorat seront présentés dans les chapitres subséquents sous la forme de trois articles, dont je suis l'auteur principal. Ces articles se rapportent aux différents volets du projet. Ces trois articles sont présentés sous la forme de manuscrit et ont récemment été soumis aux journaux avec comité de lecture. L'article démontrant que la brûlure sévère induit l'expression de l'enzyme 11 $\beta$ -HSD1 au niveau des thymocytes a été publié par *American Journal of Physiology : Endocrinology and*

*Metabolism*, et deux articles, l'un démontrant l'adaptation post-brûlure des lymphocytes T périphériques au stress oxydatif, l'autre présentant le phénomène de résistance aux GC chez ces mêmes cellules ont été soumis respectivement à *Immunology Letters* et *Critical Care Medicine*. Chacun des articles est précédé d'une mise en contexte, d'une traduction française du résumé original et du détail de la contribution de chacun des auteurs de l'article. Par la suite, l'ensemble de cet ouvrage sera synthétisé et analysé dans le dernier chapitre.

## **Chapitre 1 : Revue bibliographique**

---

## 1. Les lymphocytes T

Ce chapitre résumera les principales caractéristiques des lymphocytes T sans entrer dans les détails puisque d'autres sections de cette revue de littérature s'y attarderont. Un premier point portera sur les étapes menant à la maturation des thymocytes dans le thymus, un second point s'intéressera aux lymphocytes T matures, à leurs sous-types, aux étapes menant à leur différentiation en effecteurs de type Th1 ou Th2 et finalement au signal intracellulaire résultant de l'engagement du TcR.

### 1.1 La maturation des thymocytes

Le thymus joue un rôle clé dans la différentiation et la sélection des cellules T fonctionnelles. La maturation des thymocytes implique la régulation de l'expression de diverses protéines membranaires tel le TcR qui, couplé au CD3, permet une signalisation menant à l'activation cellulaire. L'expression différentielle des molécules accessoires CD4, CD8 ainsi que CD44 et CD25 permet de définir les étapes de la maturation des thymocytes. Le TcR est un hétérodimère formé par l'association des chaînes  $\alpha/\beta$  ou  $\gamma/\delta$ . Les cellules  $\gamma/\delta^+$  sont les premières à apparaître au stade embryonnaire. À l'âge adulte, près de 99% des thymocytes expriment un TcR  $\alpha/\beta^+$  tandis que seulement 1 % des cellules sont  $\gamma/\delta^+$  {Savino & Dardenne 2000}.

Les cellules qui entrent dans le thymus dérivent toutes de précurseurs hématopoïétiques, issus du foie fétal ou de la moelle osseuse, attirés vers l'organe par certains facteurs dont la thymotaxine {Imhof, Deugnier, et al. 1988}. De plus, différentes études ont montré la production par le thymus de diverses chimiokines incluant CXCL12, CCL21 et CCL25 qui sont responsables du peuplement du thymus fetal par les cellules progénitrices {Liu, Sinha, et al. 2005}. Parallèlement, l'expression de divers récepteurs leur permettant de lier les chémokines fut démontré à la surface des cellules hématopoïétiques se dirigeant vers le thymus {Robertson, Means, et al. 2006}. D'ailleurs, la présence du ligand PSGL-1 par les cellules progénitrices permet leur attachement à l'épithélium thymique via une interaction avec la P-selectine. Les cellules qui pénètrent dans le thymus expriment à leur

surface le marqueur Thy-1, mais sont déficientes pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TcR et les co-récepteurs CD4 $^+$  ou CD8 $^+$ . Ces cellules, doubles-négatives (DN) se logent principalement dans la partie sous-capsulaire de l'organe. La maturation des thymocytes se poursuit dans le cortex et finalement la médulla. Leur mouvement dans le thymus est assuré par l'expression de molécules d'adhésion et d'intégrines telles que : ICAM-1, CD18, CD2/LFA-3 et CD44 {Wada, Kina, et al. 1996}; {Barda-Saad, Rozenszajn, et al. 1999}. De plus, l'expression de la cadhérine-E, une protéine impliquée dans l'adhésion des cellules, à la surface des thymocytes et de l'épithélium du thymus, permet la transition de la zone sous-capsulaire au cortex {Lee, Sharow, et al. 1994}. Aussi, la présence à la surface des thymocytes DN du CD103, le ligand pour la cadhérine-E, fut démontré et corrèle avec une augmentation de leur prolifération {Kutlesa, Wessels, et al. 2002}. L'expression des récepteurs à chimiokine CXCR4 et CCR7 à la surface des thymocytes double-négatifs (DN) est cruciale pour leur progression au-delà de la jonction cortico-médullaire puisqu'une mutation dans un ou l'autre de ces gènes cause une accumulation de ces cellules à la jonction {Misslitz, Pabst, et al. 2004}.

Le rôle premier du thymus est d'établir un répertoire de cellules T capables de reconnaître et d'être activées par un éventail tout aussi étendu d'antigènes (Ag) présentés par les molécules du CMH du soi et d'éliminer les cellules auto-réactives {Vacchio & Ashwell 2000}. Lors de leur maturation, les thymocytes traversent différents points de contrôle incluant la  $\beta$ -sélection, les sélections négative et positive et parallèlement sont définis comme étant DN, double-positifs (DP) ou simple-positifs (SP) selon l'expression différentielle des marqueurs de surface (voir **Figure 1**).

Le stade DN est caractérisé par l'absence à la surface des thymocytes des marqueurs CD4 $^+$  et CD8 $^+$ . Toutefois, l'expression différentielle des marqueurs CD25 et CD44 permet de suivre leur maturation. Ainsi, 4 stades DN1 à DN4 se succèdent à travers lesquels le thymocyte en développement exprime successivement la chaîne  $\beta$  du TcR (DN3) et un pré-TcR (DN4) {Ladi, Yin, et al. 2006}. La chaîne  $\beta$  du TcR est issue du réarrangement par épissage alternatif des transcrits des gènes V, D et J {Vacchio & Ashwell 2000}. Près de la moitié des cellules DN n'expriment pas un TcR $\beta$  fonctionnel.

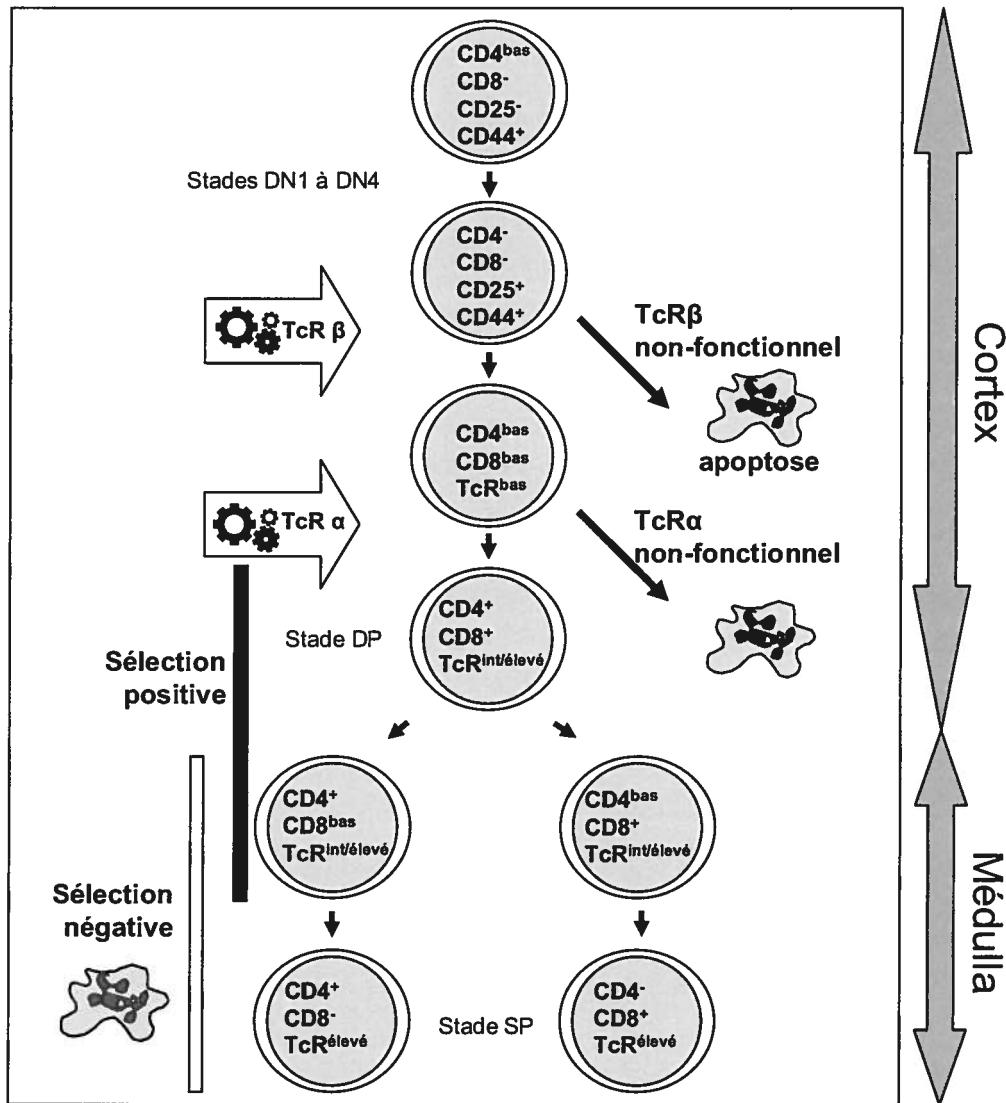
Pour parvenir à traverser ce point de contrôle qu'est la  $\beta$ -sélection, le thymocyte exprimant un TcR $\beta$  fonctionnel doit l'associer à un pré-TcR $\alpha$ . Les cellules non-fonctionnelles sont par la suite éliminées par apoptose selon un mécanisme p53-dépendant {Costello, Cleverley, et al. 2000}. Le pré-TcR est composé des chaînes accessoires  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  et de l'homodimère  $\zeta$ - $\zeta$  qui s'associent pour former le complexe CD3. Cette étape est cruciale dans la progression de la cellule au stade double-positif (DP) caractérisé par la co-expression des chaînes CD4 $^+$  et CD8 $^+$  {Shinkai, Koyasu, et al. 1993}. Les facteurs de transcription de la famille *Early Growth Response* (EGR) notamment, EGR1, 2 et 3 jouent un rôle essentiel dans le passage des thymocytes du stade DN à DP {Carleton, Haks, et al. 2002}.

Le stade DP est caractérisé par une prolifération rapide des cellules et le processus de réarrangement de la chaîne  $\alpha$  du TcR qui précèdent les sélections positive et négative. Ultimement, ce processus rigoureux empêche la progression de la maturation des cellules T non-fonctionnelles ou auto-réactives, potentiellement dommageables pour l'organisme. Les thymocytes sont en premier lieu triés selon leur habilité à reconnaître le complexe formé d'un peptide présenté par les molécules du CMH du soi exprimées à la surface des cellules épithéliales corticales du thymus. Les thymocytes ayant un TcR ne reconnaissant pas le CMH du soi sont dépourvues de toutes utilité et meurent par « négligence » selon un mécanisme apoptotique impliquant la voie mitochondriale {Vacchio & Ashwell 2000}. La sélection négative est quant à elle achevée au niveau de la jonction cortico-médullaire via l'interaction du TcR exprimé par les thymocytes DP et le CMH présentant un peptide circulant exprimé à la surface des cellules dendritiques. Ce processus double particulièrement stringant épargne seulement un faible nombre de cellules DP.

Les étapes de sélection positive et négative coïncident avec la maturation des cellules en type CD4 $^+$  ou CD8 $^+$  selon la classe des molécules du CMH avec lequel le TcR interagit et la durée de cette liaison {Werlen, Hausmann, et al. 2003}. Toutefois, des travaux menés à partir de souris transgéniques exprimant des cellules DP réactives soit pour le CMH<sub>I</sub> ou le CMH<sub>II</sub> ont démontré que la restriction au CMH ne sert pas à définir le type de cellules SP puisque des cellules CD4 $^+$  et CD8 $^+$  furent générées dans les deux cas {Itano, Salmon, et

al. 1996}. La liaison du co-récepteur CD4 ou CD8 implique un signal intracellulaire transmis par le proto-oncogène p56Lck. Hernandez-Hoyos et collaborateurs (2000) observèrent qu'en présence d'un fort inducteur de l'activation cellulaire, Lck était proportionnellement activée et la maturation du type CD4<sup>+</sup> favorisée {Hernandez-Hoyos, Sohn, et al. 2000}. Ainsi, la force et la durée du signal d'activation influencent le devenir de la cellule en type SP CD4<sup>+</sup> ou SP CD8<sup>+</sup> {Iwata, Kuwata, et al. 1996}.

L'activation cellulaire via le TcR/CD3 lors des étapes de sélection positive et négative mène à la phosphorylation des protéines MAPK. La sélection positive des cellules DP provoque l'activation de la cascade de signalisation Ras-Raf-Mek-Erk tandis que la sélection négative est contrôlée par l'activité des protéines JNK et p38 {Bommhardt, Beyer, et al. 2004}. Suite aux étapes de sélection, l'expansion des thymocytes comprend au moins 6 rondes de division cellulaire et est dépendante de l'IL-7 produite par les cellules stromales de la médulla. Elle précède l'émigration des thymocytes du thymus vers la périphérique {Penit & Vasscur 1997}.



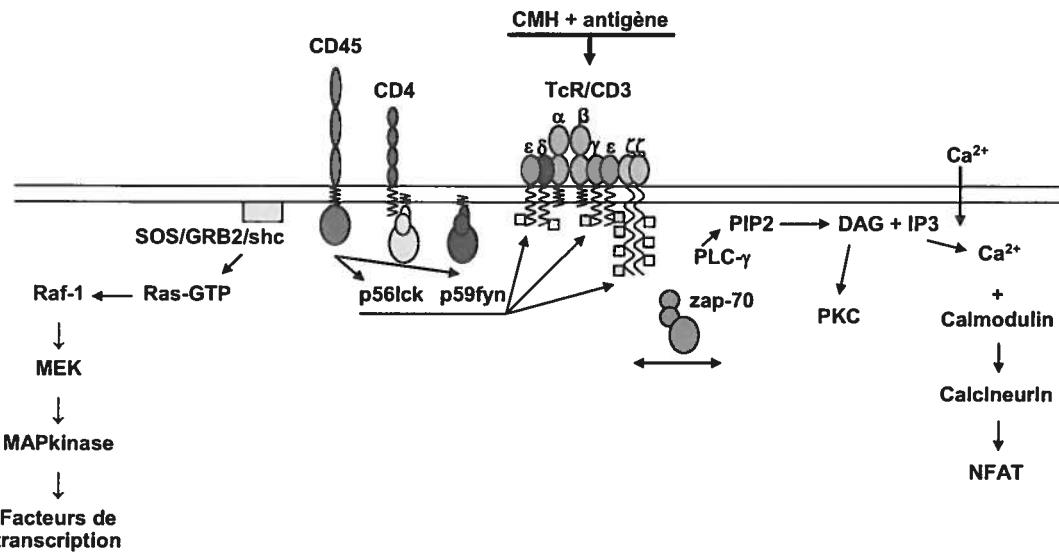
**Figure 1 :** Représentation des étapes principales menant à la maturation des thymocytes. Les cellules progénitrices attirées vers le thymus passent du stade DN (DN1 à DN4) à DP. Le réarrangement des chaînes  $\beta$  et  $\alpha$  du TcR permet aux cellules de traduire un signal d'activation suffisant menant à la sélection positive. Les cellules auto-réactives sont éliminées lors de la sélection négative. Selon la force du signal de stimulation reçu les cellules deviendront SP, inspiré de Savino & Dardenne (2000).

## 1.2 Les lymphocytes T matures

Les lymphocytes T matures résident dans les organes périphériques secondaires (ganglions lymphatiques, rate). La réponse immunitaire adaptative se produit lorsqu'une cellule T naïve rencontre une CPA. Cette interaction physique entre les membranes des deux types cellulaires crée une zone appelée synapse immunologique dans laquelle le

TcR interagit avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (signal 1) et parallèlement divers autres ligands, molécules de co-stimulation et récepteurs interagissent (signal 2) ce qui favorise l'activation des cellules T. La liaison entre le complexe CMH/peptide et TcR peut varier en force et durée. Ainsi, une période de stimulation trop courte sera inefficace pour activer la cellule T. Par contre, une courte stimulation du TcR couplée à un fort signal antigénique et à une stimulation secondaire adéquate (B7/CD28) permet la prolifération des cellules T {Lanzavecchia & Sallusto 2001}.

Le TcR est un complexe formé de 8 protéines transmembranaires. La reconnaissance d'un Ag dans le contexte du CMH est réalisée par les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du récepteur tandis que les chaînes  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ ,  $\zeta$ - $\zeta$  formant le CD3 sont essentielles à l'expression du récepteur à la membrane et à la transmission du signal à l'intérieur de la cellule. De plus, l'expression de protéines de co-stimulation telles CD4, CD8 et CD28 stabilise l'interaction entre la cellule T et la CPA. La liaison du TCR stimule de nombreuses voies de signalisation intracellulaire. Celles-ci impliquent l'activation de protéines liées à la membrane, la phosphorylation de protéines intracellulaires, la génération de messagers secondaires, et l'activation des protéines MAPKs menant à une augmentation de l'activité transcriptionnelle de nombreux facteurs dont NF-AT, NF- $\kappa$ B et AP-1. L'engagement du TcR cause la phosphorylation des *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs* (ITAMs) situés dans la portion cytoplasmique des chaînes du CD3 par les proto-oncogènes p56Lck et p59Fyn. Le recrutement de la protéine adaptatrice Zap-70 par les motifs phosphorylés cause l'activation des voies de signalisation de l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et Ras {Kung & Thomas 1997}. La Figure 2 qui suit schématise les différentes voies de signalisation intracellulaire qui sont activées suite à l'engagement du TcR.



**Figure 2 :** Principales protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire résultant de la liaison du TcR à la surface du lymphocyte T. L'engagement du TcR/CD3 via la présentation antigénique par le CMH cause le recrutement des protéines p56lck et p59fyn qui entraînent la phosphorylation des motifs ITAMs. La protéine adaptatrice ZAP-70 se lie aux motifs ITAMs phosphorylés et active les voies de signalisations Ras et IP3, inspiré de Kung & Thomas (1997).

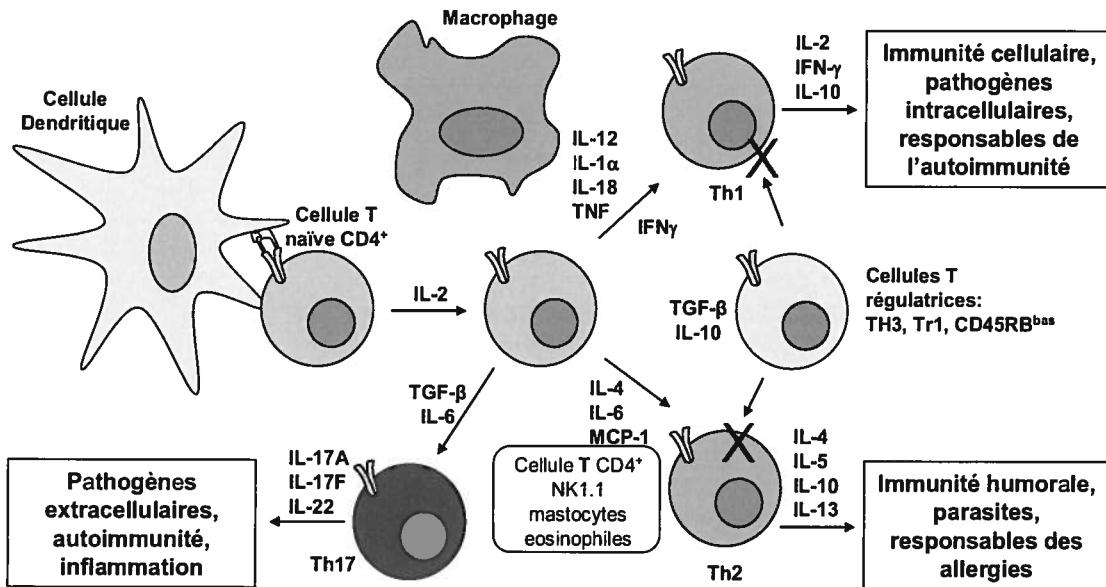
### 1.2.1 Les sous-types de lymphocytes T auxiliaires matures

Suite à leur rencontre avec une CPA, les cellules T naïves s'activent, produisent de l'IL-2 et prolifèrent rapidement (expansion clonale). La différentiation des cellules CD4<sup>+</sup> en sous-types Th1 et Th2 est influencée par divers facteurs incluant les cytokines présentes dans l'environnement immédiat, la dose et la nature de l'Ag, l'affinité du TcR pour l'Ag, et la somme des interactions entre diverses molécules de co-stimulation et leurs co-récepteurs respectifs : B7/CD28, ICAM-1/LFA-1 et CD40/CD40L. Les cellules Th1 sont importantes pour l'éradication de pathogènes intracellulaires incluant des bactéries, parasites, levures et virus. Ces cellules produisent de l'IFN-γ et de la lymphotoxine qui ont pour effet de stimuler la production de cytokines et l'activité microbiocide des macrophages. Une réponse immunitaire de type Th1 est caractérisée par la production d'Ac d'isotype IgG2a permettant de fixer les protéines du complément, l'activation des cellules NK et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Les maladies auto-immunes telles le diabète de type 1 et la sclérose en plaques sont le résultat d'une réponse de type Th1 chronique. À l'opposé, les lymphocytes de type Th2 sécrètent entre autres de l'IL-4, IL-5 et IL-13 qui

activent les mastocytes et éosinophiles et mènent à l'éradication de parasites et à la synthèse d'anticorps (Ac). Une suractivation de la réponse Th2 est responsable des allergies puisque les cytokines de ce type favorisent la synthèse d'IgE {O'Garra & Arai 2000}.

En plus du contrôle croisé qu'exercent l'un sur l'autre les types Th1 et Th2 : par exemple le patron de sécrétion des cytokines de l'un empêche le développement et l'activité de l'autre, la réponse immunitaire associée aux lymphocytes T est soumise à l'action suppressive des cellules T régulatrices. Trois types de cellules régulatrices furent caractérisés, les Tr1 productrices d'IL-10, les Th3 qui sécrètent du TGF- $\beta$  et les cellules T régulatrices CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$  productrices d'IL-10 et de TGF- $\beta$  dont l'activité suppressive est le résultat d'un contact avec une cellule cible {Piccirillo & Thornton 2004}.

Récemment, un autre type de lymphocytes T produisant de l'IL-17 et ayant une forte activité pro-inflammatoire fut identifié dans diverses maladies autoimmunes telles l'arthrite rhumatoïde, la scéroze en plaque, l'asthme et le lupus érythémateux. Ces cellules appelées Th17 dérivent d'un progéniteur commun aux cellules Th1 et Th2 dont la différentiation est favorisée par la présence d'IL-6 et de TGF- $\beta$ . La prolifération de ces cellules est dépendante de l'IL-23 {Bettelli, Oukka, et al. 2007}. La **Figure 3** qui suit illustre les différents types de lymphocytes T CD4 $^{+}$ .

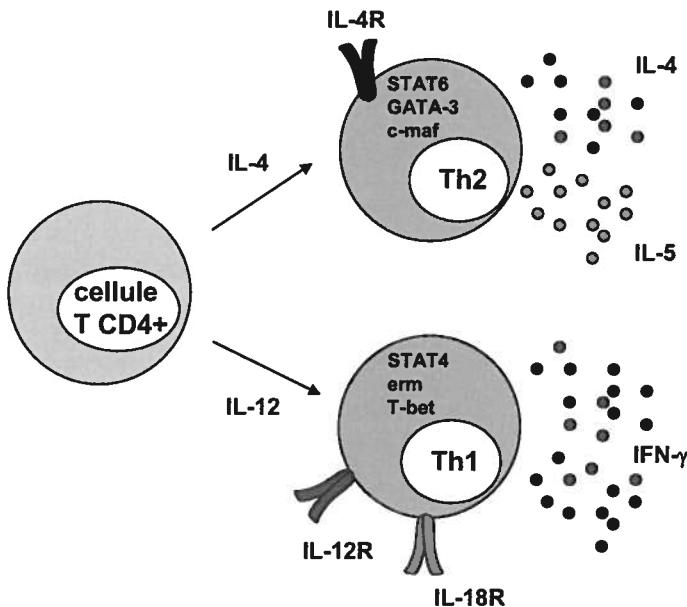


**Figure 3 :** Sous-types de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> matures. Une cellule T naïve lorsque stimulée par une CPA produit de l'IL-2, ce qui favorise sa prolifération. Cette cellule dite Th0 est sensible aux cytokines présentes dans l'environnement, à la nature de l'antigène présenté et à la force du signal reçu. Ces facteurs influencent son développement en cellule de type Th1, Th2, Th17 et T régulatrice, inspiré de O'Garra & Arai (2000).

### 1.2.2 Différentiation des cellules T naïves en types Th1 vs Th2

L'IL-12 est un déterminant majeur de la différenciation des cellules CD4<sup>+</sup> en type Th1 et ceci est favorisé par l'IFN- $\gamma$  qui d'une part, augmente l'expression du récepteur à l'IL-12 (IL-12R) à la surface des cellules T et d'autre part, inhibe la croissance des cellules de type Th2. La production d'IL-12 par les macrophages et les cellules dendritiques est provoquée par des composés d'origine microbienne ou la liaison du CD40. La liaison de l'IL-12 à la surface d'une cellule T provoque la phosphorylation de *Signal Transducer and Activator of Transcription-4* (STAT4) et stimule la production d'IFN- $\gamma$ . Les cellules de type Th1 sont caractérisées par une forte phosphorylation de la p38 MAPK et par la présence du facteur de transcription T-bet. La liaison de l'IL-4 à la surface d'une cellule T naïve active la voie de signalisation JAK1-STAT6 et favorise l'activité transcriptionnelle de *c-maf* et GATA-3. De plus, des niveaux élevés en Adénosine Mono-Phosphate cyclique (AMPc) intracellulaire, par exemple suite à l'exposition de cellules T naïves aux prostaglandines E2 (PGE2), favorisent le développement du type Th2 {O'Garra & Arai

2000}. La **Figure 4** qui suit schématise les médiateurs responsables de la conversion des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves en cellules effectrices Th1 ou Th2.



**Figure 4 :** Différenciation des lymphocytes T en type Th1 ou Th2. L'IL-12 et l'IL-4 sont les principales cytokines qui mènent à la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> en cellules effectrices de type Th1 ou Th2. Les lymphocytes Th1 produisent de l'IFN- $\gamma$  et favorisent la réponse pro-inflammatoire tandis que les cellules Th2 produisent entre autres de l'IL-4 et de l'IL-5 et stimulent la production d'anticorps, inspiré de O'Garra & Arai (2000).

## 2. Les corticostéroïdes/glucocorticoïdes/hormones de stress

Depuis leur découverte vers le milieu du siècle dernier, les GC ou corticostéroïdes sont largement utilisés pour traiter une variété de maladies inflammatoires et immunitaires. L'effet immunomodulateur des GC est relié à l'inhibition de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réaction inflammatoire et codant pour des cytokines, chimiokines, récepteurs de surface, molécules d'adhésion, facteurs tissulaires, protéinases et enzymes (cyclooxygénase (Cox) et oxyde nitrique synthétase (NOS)). Malgré les bienfaits de leur utilisation sur une période relativement courte, la prise de corticostéroïdes de manière chronique entraîne des effets indésirables au niveau physiologique tels : l'ostéoporose, le diabète, l'hypertension, les cataractes, l'amincissement de la peau et l'apparence d'un syndrome de Cushing ce qui en limitent leur utilisation {Saklatvala 2002}. L'explication réside dans le fait que ces hormones,

essentielles au bon fonctionnement de l'organisme, sont naturellement produites par le corps humain et leurs récepteurs sont présents de manière ubiquitaire. La production endogène de GC est le résultat de l'activité de l'axe HPA qui assure le contrôle de la concentration plasmatique en cortisol, la principale hormone de stress chez l'humain. On les qualifie ainsi puisque leur production est d'autant augmentée que le stimulus (stress) est intense. Le chapitre qui suit résumera l'ensemble des connaissances cumulées depuis la découverte des hormones de stress, c'est-à-dire : leurs lieux de production, leurs voies de synthèse, les divers mécanismes d'action, leurs rôles physiologiques, la modulation de la réponse immunitaire et les différents mécanismes causant une baisse de sensibilité aux GC.

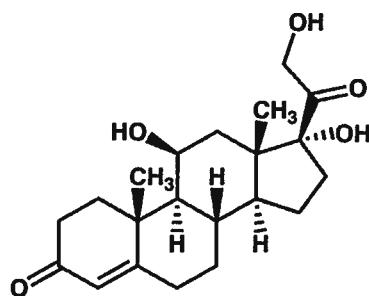
## 2.1 Découverte du cortisol

Il y a près d'un siècle, le physicien Solomon Solis-Cohen fut le premier à démontrer que l'administration par voie orale d'un extrait de glandes surrénales était bénéfique dans le traitement des symptômes de l'asthme {Solis-Cohen 1900}. Près de 50 ans plus tard, lorsque le cortisol fut isolé des glandes surrénales, un lien direct fut établi entre les effets observés par Solis-Cohen et le potentiel thérapeutique des corticostéroïdes. Cette découverte mérita à Edward C. Kendall, Tadeus Reichstein et Philip Hench, le prix Nobel de physiologie et médecine en 1950. Hench, un rhumatologue de la clinique Mayo, (Rochester, Minnesota, Etats-Unis) documenta le premier essai clinique dans lequel des patients arthritiques étaient traités avec des injections intraveineuses de cortisol {Hench, Kendall, et al. 1949}. Dès lors, de puissants GC synthétiques furent développés qui, malgré certains effets secondaires indésirables, demeurent parmi les traitements anti-inflammatoires et immunosuppresseurs les plus efficaces.

## 2.2 Caractéristiques des corticostéroïdes

Le terme stéroïde réfère à un groupe de composés lipophiles dérivés d'un précurseur commun, le cholestérol. Il existe 4 types majeurs de stéroïdes : progestines, estrogènes, androgènes et corticostéroïdes qui diffèrent l'un de l'autre par le nombre d'atomes de

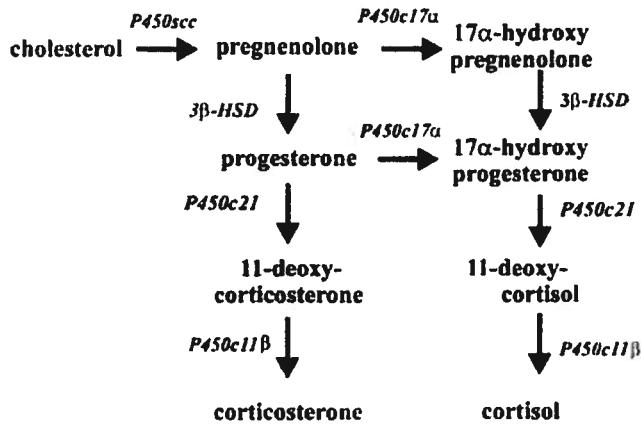
carbones qu'ils contiennent, les récepteurs qu'ils lient et leurs activités biologiques respectives. Le transport des corticostéroïdes est assuré dans la circulation sanguine grâce à la formation d'un complexe réversible avec une protéine. Près de 5-10 % de l'hormone est faiblement liée à l'albumine tandis que la grande majorité forme un complexe de haute affinité avec la *Corticosteroid Binding Globulin* (CBG). Une petite fraction (1-10%) se retrouve à l'état libre dans la circulation sanguine et est biologiquement active {Ashwell, Lu, et al. 2000}.



**Figure 5 :** Structure chimique du cortisol

Les GC sont synthétisés à partir du cholestérol en suivant une cascade séquentielle d'événements impliquant diverses enzymes membres de la famille des cytochromes P450 qui catalysent les réactions de déhydroxylation/oxydation (voir **Figure 6**). La première étape menant à la production de GC actifs est contrôlée par l'activité de l'enzyme P450scc (*side-chain cleavage*) qui clive la chaîne latérale du cholestérol et génère la pregnenolone. L'expression de P450scc est localisée au niveau des mitochondries et limitée aux tissus ayant une activité stéroïdogénique : grandes surrénales, placenta, gonades, cerveau, thymus {Miller 1995}. Par la suite, la pregnenolone subit une hydroxylation en position C17 par l'enzyme P450c17 qui mène à deux voies de synthèses parallèles. Chez les rongeurs, l'expression de la P450c17 est limitée aux gonades et l'enzyme n'est pas détectée au niveau des glandes surrénales. Ainsi, le principal GC produit chez ces animaux est le corticostérone tandis que le cortisol est prépondérant chez les humains et la majorité des autres espèces (voir **Figure 5**) {Keeney, Jenkins, et al. 1995}. La progestérone (ou sa forme 17-OH) est ensuite hydroxylée dans le réticulum endoplasmique par l'enzyme P450c21 ce qui génère du 11-deoxycorticosterone (ou 11-deoxycortisol). Finalement, ce stéroïde intermédiaire est converti dans les mitochondries

par la P450c11, aussi appelée 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (11 $\beta$ -HSD1) qui produit du cortisol (ou corticostérone) actif {Engeland, Levay-Younig, et al. 1997}.

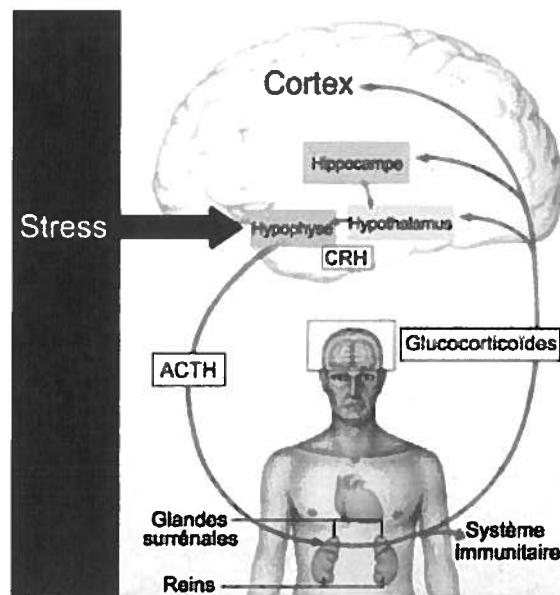


**Figure 6 :** Schéma des étapes et enzymes stéroïdogéniques impliquées dans la synthèse du corticostérone chez les rongeurs et du cortisol chez les humains. La chaîne latérale du cholestérol est clivée par l'enzyme P450scc. Les tissus exprimant l'enzyme 3 $\beta$ -HSD parviennent à synthétiser la progestérone à partir du pregnénolone. Chez les rongeurs, la progestérone est ensuite transformée en 11-deoxycorticostérone et finalement en corticostérone active via l'action de l'enzyme 11 $\beta$ -HSD, inspiré de Lechner *et al.* (2001).

### 2.2.1 Production systémique : axe Hypothalamo-Hypophysaire-Surrénalien

La réponse de l'organisme au stress implique l'activation de l'axe HPA et conduit à la production de GC (voir **Figure 7**). L'axe HPA est constitué de trois éléments principaux : l'hypothalamus, l'hypophyse et les glandes surrénales. La production de GC est initiée au niveau de l'hypothalamus par la libération de CRF aussi appelé CRH ou corticolibérine {McCann, Antunes-Rodrigues, et al. 2000}. La physiologie du cortex cérébral à cet endroit permet la communication entre l'hypothalamus et l'hypophyse. Les neurones qui sécrètent du CRH se projettent à l'extérieur de l'hypothalamus et entraînent la libération de l'hormone à travers un réseau de capillaires sanguins qui effectuent la communication entre les deux glandes {Elenkov, Wilder, et al. 2000}. Les récepteurs CRF-R1 situés à la surface des cellules corticotropes de l'adénohypophyse sont stimulés par le CRH, ce qui favorise la production et la libération d'adrénocorticotropine (ACTH) via une action du CRH sur l'accumulation d'AMPc, l'activité de la protéine kinase A et son action sur les canaux de potassium {Lim, Shipston, et al. 2002}. L'ACTH rejoint la circulation sanguine et induit la synthèse de GC dans la zone fasciculata des glandes surrénales

{Turnbull & Rivier 1997}. L'ACTH stimule la sécrétion de GC de différentes façons : A) en augmentant le nombre de récepteurs à *Low Density Lipoproteins* (LDL) permettant l'entrée du cholestérol dans les cellules corticotropes {Heikkila, Arola, et al. 1998}, B) en augmentant l'expression de l'enzyme P450scc {Di Blasio, Voutilainen, et al. 1987}, C) en hydroxylant la pregnenolone en 17-OH-pregnenolone {Kramer, McCarthy, et al. 1983}.



**Figure 7 :** Axe Hypothalamo-Hypophysaire-surrénalien. La production de cortisol est constante et suit un rythme circadien. La stimulation de l'axe via un stress entraîne une hausse de la production de CRH par l'hypothalamus. Le CRH dirigé vers l'hypophyse stimulate la production d'ACTH qui libéré dans la circulation sanguine rejoint les glandes surrénales et stimule la production de cortisol, (tiré du site web : <http://lecerveau.mcgill.ca>)

La concentration en cortisol (Cort) dans l'organisme varie en fonction du rythme circadien de l'individu. Ainsi, pour une personne diurne, la concentration plasmatique en Cort diminue tout au long de la journée, mais augmente durant le sommeil pour atteindre son maximum à l'éveil, l'inverse prévaut pour les organismes nocturnes {Angeli 1974}.

### 2.2.1.1 Mécanismes de régulation

L'activité de l'axe HPA est influencée par des stress de nature physiologique et psychologique. La présence de neurones sensibles aux signaux de douleur, chaleur et

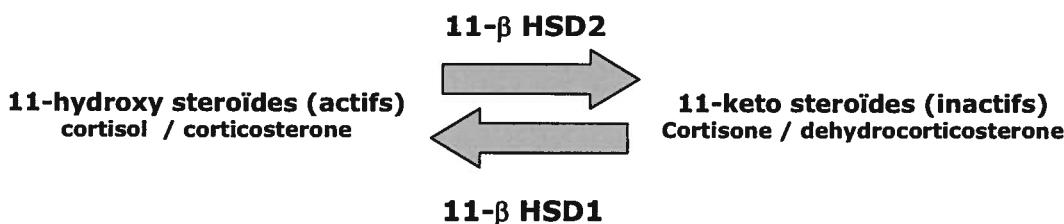
traumatisme provoque la sécrétion de CRH {Dorshkind & Horserman 2001}. En temps normal, la sécrétion hormonale de l'axe HPA est contrôlée par rétro-inhibition puisque l'excès de Cort présent dans la circulation sanguine diminue la libération de CRH et d'ACTH {Young, Kwak, et al. 1995}. Ceci est réalisé par un effet double de l'hormone au niveau des cellules corticotropes de l'hypophyse. En premier lieu, le GR activé lie un élément négatif de réponse aux GC (nGRE) qui empêche la transcription du gène codant pour la pro-opiomelanocortine (POMC). La POMC est un peptide précurseur synthétisé par les cellules corticotropes de l'hypophyse dont l'ACTH est le produit de son clivage {Nakai, Usui, et al. 1991}. En second lieu, les GC rendent ces cellules corticotropes insensibles à l'action stimulante du CRH sur la libération d'ACTH, en inhibant la phosphorylation des canaux de potassium via l'induction de la protéine phosphatase 2A {Tian, Knaus, et al. 1998}.

Les cytokines pro-inflammatoires exercent un effet positif sur l'activité de l'axe HPA. L'IL-1 $\beta$  et à un degré moindre, le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 augmentent la sécrétion hormonale de l'axe {Dunn 2000}. Le mécanisme par lequel ces cytokines stimulent la production de GC implique la liaison à leurs récepteurs exprimés à la surface des cellules corticotropes de l'hypothalamus et de l'adénohypophyse {Elenkov, Wilder, et al. 2000}. Deux voies furent identifiées pour expliquer la manière dont ces cytokines contrôlent la sécrétion de GC. Premièrement, ces médiateurs libérés au niveau des sites inflammatoires rejoignent la circulation sanguine et la liaison à leurs récepteurs spécifiques présents au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse favorise la libération de CRF et d'ACTH {Perlstein, Whitnall, et al. 1993}. Deuxièmement, les neurones cérébraux expriment les ARNm de l'IL-1 $\beta$ , du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6, la production locale de ces cytokines active de manière paracrine l'axe HPA {Turnbull & Rivier 1999}. L'injection intrapéritonéale de LPS bactérien favorise l'expression dans l'hypophyse des ARNm codant pour l'IL-1 $\beta$  et de l'enzyme de conversion de l'IL-1 (ICE) aussi nommée caspase-1, responsable du clivage de la pro-protéine IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 en leur forme mature et active. La présence de cette cytokine augmente l'expression de la forme inducible de l'enzyme NO synthétase (iNOS) dont l'activité se traduit par la production de NO. L'augmentation du NO favorise l'activité de l'enzyme Cox-1 et la production de prostaglandines. Les PGE<sub>2</sub> activent

l'enzyme adenylyl cyclase qui augmente la quantité d'AMPc intracellulaire menant à l'exocytose du CRH contenu dans des granules {McCann, Antunes-Rodrigues, et al. 2000}. En ce qui concerne l'IL-6, cette cytokine stimule l'axe en aval du CRH {Lyson & McCann 1993}. Les cellules folliculostellaires situées au niveau de l'hypophyse produisent de l'IL-6 et expriment à leur surface le CD14 et le récepteur *Toll-like* de type 4 (TLR-4) impliqués dans la liaison des LPS {Chesnokova & Melmed 2002}. Cette liaison provoque la phosphorylation de la protéine p38MAPK et une cascade de signalisation menant à la production d'IL-6 {Lohrer, Gloddek, et al. 2000}. Puisque les cellules corticotropes possèdent le récepteur pour l'IL-6 la production locale permet une régulation paracrine de leur activité et favorise la sécrétion d'ACTH dans la circulation {Bethin, Vogt, et al. 2000}.

### 2.2.2 Production locale : 11 $\beta$ -Hydroxystéroïde déshydrogénase (11 $\beta$ -HSD)

Le métabolisme des GC au stade pré-récepteur est un important mécanisme de contrôle de leur biodisponibilité et effets au niveau des tissus cibles. L'expression des enzymes 11 $\beta$ -HSD permet de modifier la concentration locale en GC et de contrôler l'activation des récepteurs à glucocorticocoïdes et à minéralocorticoïdes (MR). Deux isoformes ont été identifiées (11 $\beta$ -HSD1 et 11 $\beta$ -HSD2). Leur activité antagoniste favorise l'interconversion des formes active et inactive des GC selon des réactions d'oxydation et de réduction (voir Figure 8). Malgré plusieurs similitudes, ces deux membres de la super-famille des déshydrogénases/réductases à chaînes courtes (SDR) partagent seulement 21 % d'homologie et sont des produits de deux gènes indépendants {Draper & Stewart 2005}.



**Figure 8 :** Interconversion des GC par les enzymes 11 $\beta$ -HSD. La présence de 11 $\beta$ -HSD1 dans un tissu permet la synthèse locale de GC actifs, tandis que la 11 $\beta$ -HSD2 inactive les GC, inspiré de Draper & Stewart (2005).

### **2.2.2.1 11 $\beta$ -HSD1**

La 11 $\beta$ -HSD1 fut la première isoenzyme à être caractérisée. Elle possède une faible affinité pour son ligand et dépend de la présence du co-facteur NADP(H) pour accomplir ses fonctions. Bien que son activité *in vitro* soit bi-directionnelle, son expression *in vivo* est localisée au niveau des tissus fortement influencés par les GC où elle agit principalement comme une réductase en augmentant la concentration en GC pouvant lier le GR. La présence de l'enzyme, une protéine de 34 kDa localisée dans le lumen du réticulum endoplasmique, fut démontrée dans des préparations de poumon, foie, gonade, hypophyse, cerveau, tissu adipeux, rate et thymus {Fruchter, Zoumakis, et al. 2006}.

### **2.2.2.2 11 $\beta$ -HSD2**

La 11 $\beta$ -HSD2 est une enzyme de haute affinité dont l'activité est NAD<sup>+</sup>-dépendante. Cette protéine de 44 kDa est localisée principalement au niveau du placenta et des tissus cibles pour les minéralocorticoïdes (aldostérone) : foie, muqueuse du colon, glandes salivaires, reins. Au niveau cellulaire, on la retrouve ancrée à la membrane du réticulum endoplasmique, du côté cytosolique. Cette enzyme possède une forte affinité pour le cortisol (100 fois celle de la 11 $\beta$ -HSD1). Ceci explique son activité unidirectionnelle, essentiellement déshydrogénase, qui sert à réduire le ratio cortisol/cortisone. Ainsi, le MR est protégé du cortisol et il devient disponible pour lier les minéralocorticoïdes. Par exemple, la capacité d'inactivation des GC dans le placenta par la 11 $\beta$ -HSD2 est très importante, expliquant que la plus forte expression de l'enzyme soit retrouvée dans ce tissu {Moore, Hoong, et al. 2000}.

### **2.2.2.3 Expression et rôle de la 11 $\beta$ -HSD1 au niveau des cellules du système immunitaire**

La présence de l'enzyme 11 $\beta$ -HSD1 chez différents effecteurs de l'immunité suggère un rôle pour cette protéine dans la réponse inflammatoire. Les cellules qui expriment la 11 $\beta$ -HSD1 augmentent leur sensibilité aux GC {Chapman, Coutinho, et al. 2006}. Une étude a démontré l'activité de la 11 $\beta$ -HSD1 directement dans le thymus, la rate et les ganglions

lymphoïdes. *In vivo*, l'inhibition de l'activité de cette enzyme diminue la production de cytokines de type 1 et augmente la synthèse d'IL-4 et d'IL-10 chez les lymphocytes T activés {Hennebold, Ryu, et al. 1996}. La présence de la 11 $\beta$ -HSD1 a été remarquée dans le thymus fétal et adulte de souris et représente 6 à 7 % de l'expression de l'enzyme dans le foie. De plus, l'expression de l'enzyme directement chez les thymocytes CD3 $^+$  (matures) logés dans la médulla et la jonction cortico-médullaire suggère une rôle pour cette protéine au-delà de la sélection positive {Nuotio-Antar, Hasty, et al. 2006}. Aussi, la présence de l'enzyme directement au niveau de cellules T murines CD4 $^+$  et CD8 $^+$ , de lymphocytes B et de cellules dendritiques a été démontrée. Dans ces cellules, cette protéine possède une activité essentiellement réductase lui permettant de convertir la cortisone en cortisol. La stimulation de cellules T CD4 $^+$  augmente l'expression de la 11 $\beta$ -HSD1. La présence de l'enzyme est suffisante pour permettre la conversion de cortisone en Cort et la transcription de l'IL-7Ra et de *Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper* (GILZ), deux gènes contrôlés par les GC {Zhang, Ding, et al. 2005}.

Le rôle de la 11 $\beta$ -HSD1 dans la réponse inflammatoire a été précisé par une équipe de chercheurs qui démontre que la différentiation des monocytes en macrophages permet l'expression de la 11 $\beta$ -HSD1. De plus, l'exposition au LPS de cellules THP-1, une lignée de macrophage humain, multiplie par 4 le niveau de 11 $\beta$ -HSD1 {Thieringer, Le Grand, et al. 2001}. L'augmentation de l'expression et de l'activité réductase de la 11 $\beta$ -HSD1 a aussi été montrée *in vivo* dans un modèle utilisant une injection de thioglycolate comme agent d'activation de macrophages. L'expression de la 11 $\beta$ -HSD1 dans ces cellules corrèle avec une augmentation de l'activité de phagocytose et une clairance plus rapide de cellules apoptotiques {Gilmour, Coutinho, et al. 2006}. Récemment, deux études portant sur le rôle de la 11 $\beta$ -HSD1 dans la production de médiateurs de l'inflammation par des macrophages activés ont été publiées. Dans la première, l'inhibition pharmacologique de la 11 $\beta$ -HSD1 a diminué la production des cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et de la chimiokine MCP-1 {Ishii, Masuzaki, et al. 2007}. Dans la seconde, une augmentation de la production de TNF- $\alpha$ , d'IL-6 et d'IL-12 a été remarquée chez les macrophages de souris 11 $\beta$ -HSD1 $^{-/-}$  {Zhang & Daynes 2007}. Quoique conflictuels, ces deux résultats suggèrent un rôle pour la 11 $\beta$ -HSD1 dans la réponse inflammatoire.

#### **2.2.2.4 Régulation de l'expression de la 11 $\beta$ -HSD1 par les médiateurs de l'inflammation**

Le contrôle de l'expression de la 11 $\beta$ -HSD1 au sein des cellules est un moyen de modifier la concentration intracellulaire en GC actifs. Quelques études ont montré dans divers types cellulaires (ex. adipocytes, ostéoblastes, trophoblastes, fibroblastes, cellules épithéliales de l'ovaire et cellules rénales glomérulaires) que les médiateurs de l'inflammation tels l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  augmentaient l'expression de l'enzyme et rendaient ces cellules plus sensibles aux GC. Dans les cellules glomérulaires cette situation se traduit par une diminution de la transcription de la phospholipase A2 (PLA2) {Escher, Galli, et al. 1997}. Chez les ostéoblastes, les auteurs de l'étude ont remarqué une augmentation de l'activité de la 11 $\beta$ -HSD1 couplée à l'inactivation de la 11 $\beta$ -HSD2 {Cooper, Bujalska, et al. 2001}. Au niveau du tissu adipeux, la présence de la 11 $\beta$ -HSD1 et l'augmentation de son activité par le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  a été associé avec l'obésité des rats Zucker {Tomlinson, Moore, et al. 2001}. Yong et collaborateurs (2002) ont démontré que l'IL-1 $\beta$  produit durant la réponse inflammatoire qui accompagne l'ovulation permet d'augmenter l'expression et l'activité de la 11 $\beta$ -HSD1 au niveau des cellules épithéliales de l'ovaire ce qui constitue un mécanisme local de résolution de l'inflammation {Yong, Harlow, et al. 2002}. Durant la grossesse, les GC produits au niveau de l'utérus et du placenta influencent la maturation du fœtus et procurent un micro-environnement protecteur contre le système immunitaire de la mère. Les fibroblastes et trophoblastes du chorion (membrane externe du foetus) expriment la 11 $\beta$ -HSD1 et une augmentation de son expression et activité a été remarquée chez les cellules exposées à l'IL-1 $\beta$ . De plus, leur co-exposition au Dexamethasone (Dex), un puissant GC synthétique, a favorisé cette augmentation {Sun & Myatt 2003}; {Li, Gao, et al. 2006}.

### **2.3 Le récepteur à glucocorticoïdes (GR)**

Le GR est un membre de la famille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes et possède une fonction de facteur de transcription ligand-dépendante au même titre que les récepteurs aux estrogènes, à la progestérone, aux minéralocorticoïdes ainsi qu'aux

hormones thyroïdiennes {Webster, Tonelli, et al. 2002}. Son expression est ubiquitaire et indispensable à la vie. Des souris GR<sup>-/-</sup> ont été générées par recombinaison homologue et aucune n'a survécu à la naissance en raison d'un retard dans le développement des poumons {Schmid, Cole, et al. 1995}. Les GC produisent leurs effets via leur interaction avec deux types de récepteurs, soit le GR (ou de type II) et le MR (de type I). L'affinité du Cort est plus grande pour le MR ( $K_D = 0.5 - 1 \text{ nM}$ ) que pour le GR ( $K_D = 5 - 10 \text{ nM}$ ), ce qui implique une occupation plus importante du MR par l'hormone dans des conditions basales. Toutefois, lors de stress intenses, l'expression des deux types de récepteurs peut être modifiée ce qui amène une plus grande occupation du GR par le Cort {Deak, Nguyen, et al. 1999}. Tandis que le GR est exprimé de manière ubiquitaire, le MR est principalement retrouvé au niveau des reins et du foie. De plus, la densité de ces deux types de récepteurs est hétérogène parmi les divers tissus et cellules du système immunitaire. Il a été observé que le thymus exprimait exclusivement du GR et ce, plus abondamment que n'importe quel autre organe du système immunitaire {Miller, Spencer, et al. 1998}. La rate, de même que les ganglions lymphatiques et les PBMC expriment des niveaux similaires de MR et de GR. L'hétérogénéité de l'expression de ces deux types de récepteurs explique la sensibilité notable des thymocytes aux corticostéroïdes {Miller, Spencer, et al. 1998}.

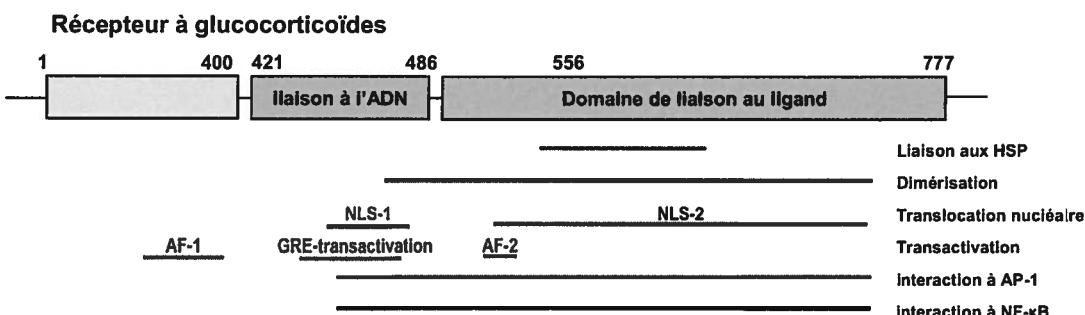
### 2.3.1 Isoformes du GR

Chez l'humain, deux isoformes du GR ont été initialement décrites,  $\alpha$  et  $\beta$ , tandis que seulement l'isoforme  $\alpha$  est présente chez les rongeurs. Yudt et Cidlowski (2002) ont découvert différent sites d'initiation de la traduction contenus dans l'exon-2 et ont proposé l'existence d'isoformes additionnelles portant à 4 les variants du GR : GR $\alpha$ -A, GR $\alpha$ -B, GR $\beta$ -A, GR $\beta$ -B {Yudt & Cidlowski 2002}. L'isoforme  $\alpha$  est la forme la plus abondante, exprimée de manière constitutive dans les cellules et la seule possédant une activité transcriptionnelle {Leung, Hamid, et al. 1997}. Le GR $\beta$  consiste en une forme tronquée du GR $\alpha$  où l'épissage alternatif du transcript primaire permet de remplacer les 50 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale par une séquence de 15 acides aminés. Cette modification empêche la liaison de l'hormone au récepteur et le rend

transcriptionnellement inactif {Bamberger, Bamberger, et al. 1995}. Contrairement au GR $\alpha$  qui est présent principalement dans le cytoplasme, le GR $\beta$  est exprimé dans le noyau où il agit comme dominant-négatif en empêchant la liaison à l'ADN du GR $\alpha$  via la formation d'hétérodimères GR $\alpha$ /GR $\beta$ . De plus, l'expression du GR $\beta$  semble limitée à l'espèce humaine {Oakley, Sar, et al. 1996}.

### 2.3.1.1 Structure du récepteur

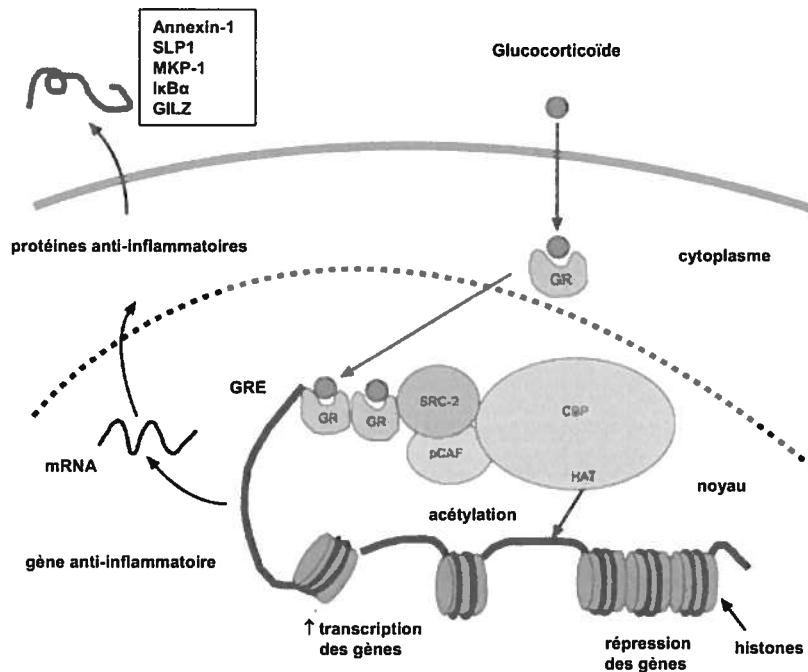
De manière classique, les GC accomplissent leurs effets en liant l'isoforme  $\alpha$  du GR. Chez l'humain, cette protéine de 95 kDa est formée de l'association de 777 acides aminés. Le GR est exprimé de manière ubiquitaire dans le cytoplasme et sa densité par cellule varie entre 200 à 30000 récepteurs. L'affinité pour le cortisol, principale hormone de stress chez l'humain, est de 5-10 nM, ce qui corrèle avec la concentration de l'hormone libre dans le plasma. Le GR est divisé en trois domaines, le premier situé en N-terminal permet la transactivation lors de la liaison à l'ADN du récepteur, le second permet la liaison à l'ADN et le troisième, la liaison à l'hormone. Le GR inactif fait partie d'un complexe totalisant 300 kDa formé des protéines chaperones *Heat Shock Proteins* HSP90, HSP70 et HSP27, de même qu'une immunophiline p59. Les différents domaines du GR $\alpha$  sont représentés dans la Figure 9 qui suit.



**Figure 9 :** Structure du récepteur à glucocorticoïdes humain. Le GR est divisé en trois domaines qui permettent la transactivation, la liaison à l'ADN et la liaison au ligand. Le domaine de liaison au ligand permet aussi son association aux protéines HSP et la dimérisation du récepteur, tiré de Adcock & Ito (2005).

### 2.3.1.2 Complexe transcriptionnel du GR

Suite à la liaison de l'hormone au GR, le récepteur se dissocie de son complexe et se dirige vers le noyau. Son entrée est favorisée par deux séquences de localisation nucléaires (NLS), la première située dans le domaine de liaison à l'ADN, la seconde dans le domaine de liaison au ligand. C'est l'interaction entre ces séquences et les protéines karyopherin et importin- $\alpha$  qui permet l'ancreage du GR activé au complexe protéique formant le pore nucléaire (NPC). Le passage du GR à travers la membrane nucléaire est le résultat de l'activité GTPase des protéines Ran/TC4 et pp10/NF2 associées au NPC {Kohler, Haller, et al. 1999}. À ce moment, deux monomères de GR activés s'associent entre eux pour former un dimère ayant une activité transcriptionnelle. L'homodimérisation est réalisée par l'interaction des motifs en hélice-10 présents au niveau de la partie N-terminale du domaine de liaison au ligand {Bledsoe, Montana, et al. 2002}. Le dimère de GR reconnaît sur l'ADN un élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) et grâce aux motifs à doigts de zinc du domaine de liaison à l'ADN, s'y associe. Le GRE est une séquence palindromique de 15 paires de bases, GGTACAnnnTGTTCT où n peut être un nucléotide quelconque. Le nombre de ces séquences de même que la présence de boîtes TATA à proximité d'un gène en augmentent sa transcription. La liaison du GR à l'ADN conduit au recrutement de molécules co-activatrices comme la protéine liant CREB (CBP/p300) et le co-activateur du récepteur aux stéroïdes (SRC). La CBP/300 possède une activité intrinsèque histone acétyltransférase (HAT) qui lui permet de dérouler l'ADN des histones et d'ainsi rendre le gène plus accessible à la machinerie transcriptionnelle. Cette machinerie est composée de la RNA polymérase II, de la protéine d'interaction au GR (GRIP-1), de la protéine de liaison à TATA (TBP) ainsi que des facteurs associés à la TBP (TAF) et des membres de la famille « switch » (SWI) {Robyr, Wolffe, et al. 2000}. Le complexe transcriptionnel du GR est représenté dans la **Figure 10** qui suit.



**Figure 10 :** Complexe transcriptionnel du récepteur à glucocorticoïdes. La liaison de l'hormone au récepteur permet son entrée dans le noyau. La dimérisation du récepteur et le recrutement de protéines formant le complexe transcriptionnel actif permet l'accès aux séquences GRE sur l'ADN et la transcription de gènes dont l'expression est contrôlée par les GC, inspiré de Barnes (2006).

### 2.3.2 Transcription des gènes sous l'influence des GC

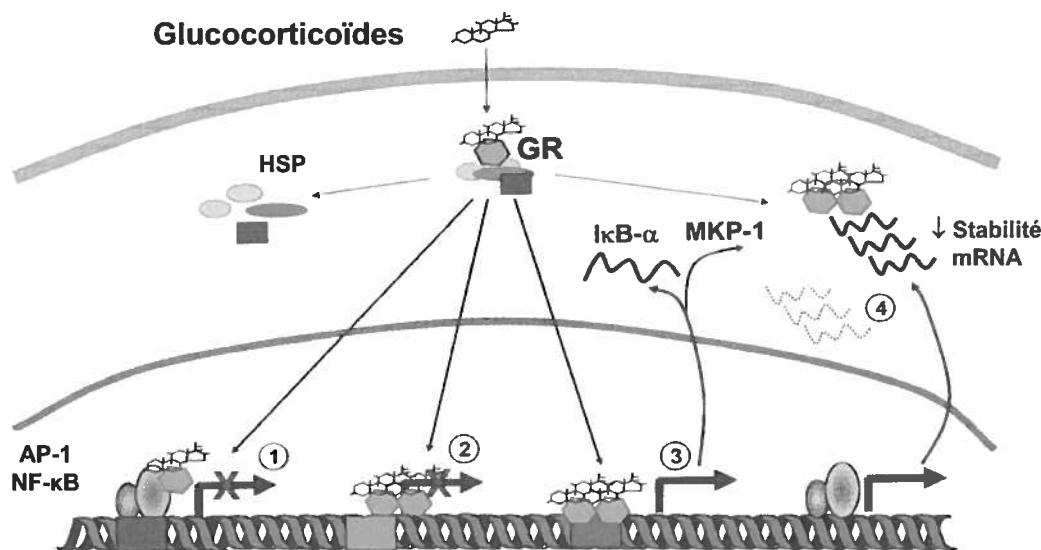
Les GC produisent leurs effets dans les cellules cibles en activant le GR qui directement ou indirectement contrôle la transcription de gènes cibles. Le nombre de gènes par cellule dont l'expression est influencée par les GC varie entre 10 et 100 et la plupart d'entre-eux le sont indirectement via l'interaction du GR avec d'autres facteurs de transcription et molécules co-activatrices {Hayashi, Wada, et al. 2004}. Une étude ayant pour sujet les actions suppressives et permissives des GC chez les lymphocytes, a démontré à l'aide de biopuces que l'expression de près de 20 % des gènes était contrôlée soit positivement ou négativement par ces hormones {Galon, Franchimont, et al. 2002}. Le **Tableau 1** résume l'éventail des gènes impliqués dans la réaction inflammatoire et influencés par les GC.

Transcription diminuée par les GC	Transcription augmentée par les GC
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Chimiokines IL-8, Rantes, MIP-1<math>\alpha</math>, MCP-1, MCP-3, MCP-4, eotaxin</li> <li>▪ Cytokines Interleukines-1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 18, TNF-<math>\alpha</math>, GM-CSF, SCF</li> <li>▪ Enzymes inducibles iNOS, COX-2, phospholipase A2 cytoplasmique</li> <li>▪ Récepteur à l'endothelin-1, récepteur à neurokinin NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub></li> <li>▪ Molécules d'adhésion ICAM-1, E-selectin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Lipocortin-1/annexin-1 (inhibiteur de phospholipase A<sub>2</sub>)</li> <li>▪ Récepteur B<sub>2</sub>-adrénergique</li> <li>▪ SLP-1</li> <li>▪ IL-1 récepteur antagoniste</li> <li>▪ IL-1 R2</li> <li>▪ I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></li> <li>▪ CD163</li> <li>▪ MKP-1</li> <li>▪ GILZ</li> <li>▪ GITR</li> </ul>

**Tableau 1 :** Gènes reliés à l'inflammation dont la transcription est modifiée par l'action des GC, tiré de Hayashi, Wada, *et al.* (2004).

### 2.3.2.1 Mécanismes de répression de la transcription des gènes par le GR

Le complexe du GR peut diminuer l'expression de certains gènes selon 4 mécanismes différents (voir **Figure 11**). Premièrement, par transrépression, le GR monomérique peut lier directement les facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B et ainsi diminuer leur activité transcriptionnelle. Ceci a pour effet de diminuer la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires. Deuxièmement, le GR dimérique peut lier l'ADN sur une séquence GRE incluse dans le site de liaison à l'ADN d'un facteur impliqué dans la transcription de gènes pro-inflammatoires et ainsi empêcher leur synthèse. Troisièmement, le GR dimérique peut induire l'expression de gènes tels GILZ, I $\kappa$ B et *MAPK phosphatase-1* (MKP-1). Finalement, les GC peuvent augmenter le niveau de ribonucléases et de protéines déstabilisant l'ARNm, réduisant les niveaux de certains mRNA encodant pour le CSF-1, MCP-1 et l'enzyme NOS2 {Goulding 2004}.



**Figure 11 :** Mécanismes de répression de la transcription des gènes par le GR. Le GR activé peut lier AP-1 et NF-κB et empêcher leur activité transcriptionnelle (transrépression) (1). Le GR dimérique peut lier l'ADN au niveau d'un site GRE inclus dans le promoteur d'un gène et empêcher sa transcription (2). Le GR peut lier l'ADN et favoriser la transcription de gènes empêchant l'action de certaines protéines (3). Finalement, le GR peut augmenter l'activité de certaines ribonucléases diminuant la durée de vie de certains ARNm, tiré de Adcock & Ito (2005).

### 2.3.2.1.1 Transrépression

Aux concentrations physiologiques, certains effets anti-inflammatoires reliés aux GC sont le résultat d'une interaction protéine/protéine entre le GR et d'autres facteurs de transcription tels que AP-1, NF-κB de même que C/EBP $\beta$ , tous trois impliqués dans l'expression de gènes pro-inflammatoires {Webster, Tonelli, et al. 2002}. AP-1 est un facteur de transcription formé d'un homodimère ou d'hétérodimères des protéines c-Fos et c-Jun. Sa liaison au site AP-1 permet l'expression des cytokines IL-2, IFN- $\gamma$  et IL-1 {Adcock 2000}. L'étude de Granelli-Piperno et collègues a été la première à suggérer une interférence entre les GC et AP-1 {Granelli-Piperno, Nolan, et al. 1990}. Le GR monomérique peut aussi lier la sous-unité p65 de NF-κB grâce à la présence en C-terminal de deux acides aminés (Arg-488, Lys-490) dans le second motif en doigts de zinc {Liden, Delaunay, et al. 1997}.

### **2.3.2.1.2 Recrutement de protéines HDACs**

Les modifications au niveau de la chromatine jouent un rôle dans l'expression des gènes. Ainsi, l'acétylation des histones sur certains résidus lysine par les protéines HAT favorise le déroulement de l'ADN et l'accès au promoteur pour le complexe transcriptionnel. À l'inverse, l'hypoacétylation induite par l'activité des protéines Histones Déacétylases (HDACs) est associée à une suppression de l'expression génique {Allfrey, Faulkner, et al. 1964}. Les propriétés anti-inflammatoires des GC reposent sur le recrutement de protéines HDACs au niveau du complexe transcriptionnel. Chez les macrophages alvéolaires, la synthèse des ARNm de médiateurs pro-inflammatoires tels l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et l'IL-8 est diminué par le recrutement de HDAC-2 {Ito, Barnes, et al. 2000}. Plus précisément, le GR activé favorise le recrutement de HDAC-2 au niveau du complexe transcriptionnel HAT associé à la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B ce qui diminue la transcription de gènes sous le contrôle de NF- $\kappa$ B tels l'IL-1 $\beta$  et GM-CSF {Ito, Lim, et al. 2001}. Récemment, la même équipe a montré que la perte de HDAC-2 n'entraîne aucun changement au niveau de la translocation du GR dans le noyau, ni sa liaison avec le GRE, ni même l'induction de gènes sous son contrôle mais empêche sa liaison à NF- $\kappa$ B. Suite à la liaison de l'hormone au GR, le récepteur est acétylé aux lysines situées en position 494 et 495. Le recrutement de HDAC-2 est nécessaire pour désacétyler le récepteur et ainsi permettre sa liaison à p65, ce qui empêche la transcription des gènes sous le contrôle de NF- $\kappa$ B {Ito, Yamamura, et al. 2006}.

### **2.3.2.1.3 Induction de gènes répresseurs**

Les GC favorisent l'expression de certaines protéines dont l'effet est de diminuer la réponse immunitaire. Une de ces protéines est I $\kappa$ B $\alpha$  dont le rôle est d'inhiber l'activité du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Ce facteur est composé d'une protéine p65, c-Rel ou Rel-B qui contiennent toutes trois un domaine C-terminal de transactivation et de l'une ou l'autre des protéines p50 et p52 (NF- $\kappa$ B2) qui possèdent un site d'interaction avec les membres de la famille I $\kappa$ B {McKay & Cidlowski 1999}. Ainsi, les hétérodimères de la famille NF- $\kappa$ B se trouvent confinés au cytoplasme lorsque liés à la protéine inhibitrice

I $\kappa$ B. Un des effets de l'interaction entre les cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  ou IL-1 et leur récepteur spécifique est la phosphorylation d'I $\kappa$ B qui mène à son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. La libération de NF- $\kappa$ B permet la transcription dans le noyau des gènes de cytokines pro-inflammatoires {Almawi & Melemedjian 2002}.

Une autre action génomique anti-inflammatoire des GC est médiée par l'expression de la MKP-1 dont le rôle est d'atténuer le signal intracellulaire impliquant les voies des MAPKs ERK, JNK et p38. MKP-1 est une protéine phosphatase à double-spécificité qui inactive les MAPKs en ciblant les résidus phosphorylés thréonine et tyrosine {Keyse 2000}. La protéine MKP-1 est essentielle dans le contrôle négatif de la réponse immunitaire innée. L'injection de faibles doses de LPS à des souris MKP-1<sup>-/-</sup> provoque une réponse inflammatoire exagérée et mène à leur mort par choc septique (Salojin et al. 2006). L'induction de l'expression de MKP-1 par les GC a été expliquée par la présence de 3 séquences GRE dans le promoteur de cette protéine {Noguchi, Metz, et al. 1993}. L'expression de MKP-1 est rapide et soutenue. L'exposition de mastocytes au Dex (1 nM) mène à la synthèse de l'ARNm codant pour MKP-1 et de la protéine respectivement après 30 minutes et 5 heures. Malgré la stimulation de ces cellules, l'inactivation de ERK 1/2 est observée {Kassel, Sancono, et al. 2001}. Aussi, l'exposition de cellules Hela au Dex diminue l'expression de la Cox-2 selon un mécanisme impliquant l'induction de MKP-1 et la déphosphorylation de la p38 MAPK. Parallèlement, les mêmes auteurs ont démontré que l'expression de MKP-1 nécessite une p38 MAPK active {Lasa, Abraham, et al. 2002}. L'exposition de macrophages au LPS stimule les 3 voies des MAPK et la production de TNF- $\alpha$ . Chez ces cellules, l'expression de l'ARNm de MKP-1 est augmentée après 1 heure d'exposition et sa stabilisation est fortement contrôlée par l'activité de ERK 1/2. Conséquemment, l'inactivation des voies p38 et JNK et une diminution de la production de TNF- $\alpha$  a été noté. Les auteurs ont confirmé qu'une exposition au Dex menait à l'expression de MKP-1 dans ces cellules {Chen, Li, et al. 2002}. La présence de MKP-1 a été détectée au niveau des synoviocytes isolés de patients arthritiques et leur exposition au Dex coïncide avec une diminution de la phosphorylation de ERK, JNK et p38 {Toh, Yang, et al. 2004}.

## 2.4 Effets biologiques des glucocorticoïdes

### 2.4.1 Effets physiologiques

Les GC exercent plusieurs fonctions dans l'organisme. Premièrement, au niveau métabolique, ils favorisent le catabolisme des graisses et des protéines et permettent la gluconéogénèse par les cellules hépatiques. Parallèlement, les GC diminuent l'utilisation du glucose par les tissus périphériques et augmentent ainsi la disponibilité du sucre pour les organes vitaux. Ces hormones facilitent l'action lipolytique des catécholamines (adrénaline et noradrénaline) ainsi que la redistribution des graisses de la périphérie au tronc. Les GC contrôlent la balance électrolytique en augmentant l'absorption des ions  $\text{Na}^+$ , en diminuant l'absorption des ions  $\text{Ca}^{2+}$  ainsi qu'en favorisant l'excrétion des ions  $\text{K}^+$  et  $\text{H}^+$  par les cellules du tractus gastro-intestinal {Sapolsky, Romero, et al. 2000}. Les GC influencent la masse osseuse en diminuant le processus de minéralisation via un effet direct sur l'activité des ostéoblastes {Patschan, Lodenkemper, et al. 2001}. Ces cellules produisent une protéine, l'ostéocalcine dont le rôle est d'augmenter la densité osseuse. Le promoteur de l'ostéocalcine contient un élément nGRE qui influence à la baisse la transcription du gène en présence de GC {Meyer, Gustafsson, et al. 1997}. Le rôle principal des GC sur le système cardio-vasculaire est de maintenir la pression sanguine {Grunfeld 1990}. Ceci est réalisé via l'action positive de ces hormones sur l'expression des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques situés à la surface des muscles lisses qui entourent les petits vaisseaux sanguins {Collins, Caron, et al. 1988}.

### 2.4.2 Effets sur les cellules du système immunitaire

Vers la fin des années 40, le système immunitaire fut identifié comme étant sensible à l'action des GC. Il a été démontré que l'activité de l'axe HPA via la production de GC par le cortex surrénalien pouvait réduire la réaction inflammatoire {Hench, Kendall, et al. 1949}. Des doses pharmacologiques de GC sont immunosuppressives sur presque tous les effecteurs de la réponse immunitaire qu'elle soit innée ou acquise, cellulaire ou humorale {Webster, Tonelli, et al. 2002}. Les GC suppriment l'adhésion cellulaire, la migration des granulocytes, l'activation des macrophages, la présentation antigénique, l'expression du

TcR, l'activation ainsi que la prolifération et la différentiation des lymphocytes T, finalement la production d'Ac par les cellules B {Almawi & Melemedjian 2002}.

#### 2.4.2.1 Thymocytes

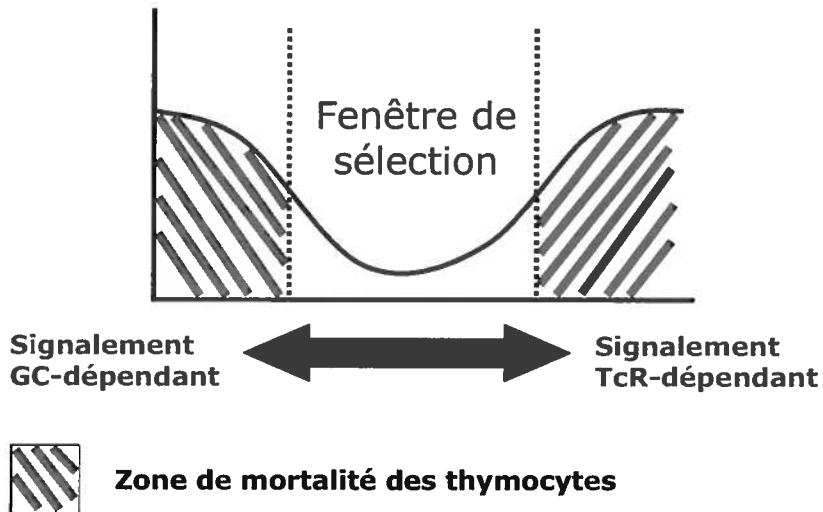
Les effets des GC sur les effecteurs de l'immunité sont causés par l'interaction de ces hormones avec son récepteur cytosolique. Une étude a révélé que la quantité de GR était de 3 à 4 fois plus élevée dans le thymus que dans la rate, ce qui explique en partie la plus grande sensibilité des thymocytes aux GC {Miller, Spencer, et al. 1998}. Ainsi, une forte concentration de GC dans la circulation sanguine entraîne une atrophie du thymus et une légère baisse de cellularité dans la rate et les ganglions mésentériques. La diminution du nombre de cellule est attribuable à leur apoptose. La sensibilité des thymocytes aux GC ainsi que l'expression du GR diffèrent à travers les sous-populations du thymus. Il a été démontré que l'expression du GR est forte au stade DN, diminue au stade DP et augmente chez les cellules matures {Berki, Palinkas, et al. 2002}. La variation de l'expression du GR au stade DN suit l'expression en surface du CD25. La signalisation à partir du pré-TcR précède la diminution de l'expression du GR observé au stade DP. La sensibilité des thymocytes aux GC n'est pas liée à la quantité de GR exprimé puisque les cellules DP sont les plus susceptibles à l'effet délétère des GC {Brewer, Sleckman, et al. 2002}. L'apoptose des thymocytes induite par les GC dépend de l'interaction entre le GR activé et la proto-oncogène Src. Cette liaison mène à la phosphorylation de la phospholipase C spécifique au phosphatidylinositol (PI-PLC) ainsi que l'activation de la sphingomyélinase acide (aSMase). Ceci a pour effet d'augmenter la perméabilité de la membrane mitochondriale, d'induire la libération de cytochrome C ce qui mène à l'activation des caspases-8, -9 et -3 {Marchetti, Marco, et al. 2003}.

De nombreuses études suggèrent un lien physiologique entre les GC et la maturation des thymocytes, mais ce sujet demeure litigieux puisque les conclusions de divers travaux ne parviennent pas à établir un consensus (voir **Tableau 2**). La première étude qui suggéra un rôle des GC dans la maturation des thymocytes a fait la démonstration de la présence des enzymes stéroïdogéniques au niveau des cellules épithéliales du thymus (TEC) et de

la synthèse locale de GC biologiquement actifs {Vacchio, Papadopoulos, et al. 1994}. L'étude de Pazirandeh et collaborateurs a par la suite confirmé l'expression des enzymes 11- $\alpha$  hydroxylase (P450scc), 21-hydroxylase et 11 $\beta$ -HSD1 au niveau de la membrane mitochondriale des TEC chez la souris et démontré dans un modèle *in vitro* de co-culture cellulaire (TEC-thymocytes) que la synthèse locale de GC provoque l'apoptose des thymocytes et son inhibition préserve en partie leur viabilité {Pazirandeh, Xue, et al. 1999}. Zilberman et collègues (2004) ont confirmé les précédents résultats en utilisant une lignée de lymphome résistante à l'apoptose par les GC. Ils ont montré que la ré-expression du GR dans ces cellules permet leur apoptose lorsque co-cultivées avec des TEC {Zilberman, Zafirir, et al. 2004}. L'importance de la synthèse locale de GC a été confirmé dans l'étude de Pazirandeh et collaborateurs qui montre qu'en surexprimant le GR dans des thymocytes, il est possible d'induire l'apoptose de ces cellules même chez des souris surrénalectomisées {Pazirandeh, Jondal, et al. 2005}. Par ailleurs, l'interaction des thymocytes avec la structure thymique est essentielle pour induire l'expression des enzymes stéroïdogéniques {Lechner, Wiegers, et al. 2000}. Parallèlement, Jenkinson et collègues ont remarqué que les thymocytes DP prêts à subir la sélection positive expriment l'enzyme P450scc, ce qui attribue un rôle à la génération intracellulaire des GC dans la maturation de ces cellules {Jenkinson, Parnell, et al. 1999}. Toutefois, seule, la synthèse locale de GC n'est pas suffisante pour assurer le développement normal des thymocytes puisque dans un modèle de souris surrénalectomisée, une atrophie thymique a été observée et l'administration exogène de GC a permis de restaurer l'homéostasie dans le thymus {Pruett & Padgett 2004}.

Pour expliquer le rôle des GC dans la sélection des thymocytes, Vacchio et Ashwell (1997) ont proposé le concept *d'antagonisme mutuel* définissant le rôle que jouent respectivement la signalisation via le TcR et celui via le GR dans la maturation des thymocytes {Vacchio & Ashwell 1997}. La première étude menant à ce concept fut la découverte, lors d'expériences *in vitro*, que l'apoptose causée par la stimulation des thymocytes via le TcR était inhibée par leur exposition aux GC et vice-versa {Zacharchuk, Mercep, et al. 1990}. Ce concept stipule que la production locale de GC dans le thymus permet l'activation du GR qui contre-balance le signal émis par

l'engagement du TcR lors de la sélection positive des thymocytes. Ainsi, les GC produits par les cellules épithéliales du thymus entraînent l'apoptose des thymocytes DP ayant un TcR ne produisant pas un signal assez puissant menant à l'activation cellulaire {Zilberman, Yefenof, et al. 1996}. De plus, les GC atténuent la signalisation via la TcR des chaînes des protéines ZAP-70 et LAT qui s'associent aux chaînes  $\zeta$ - $\zeta$  du complexe CD3, en modifiant leur localisation à la membrane cellulaire ce qui diminue leur phosphorylation {Van Laethem, Baus, et al. 2001}. Parallèlement, la stimulation *in vitro* de thymocytes via des Ac dirigés contre le TcR/CD3 protège ces cellules de l'apoptose induite par une dose physiologique de GC {Iwata, Hanaoka, et al. 1991}. Cet effet a été observé spécifiquement au niveau des thymocytes SP et une sous-population de cellules DP au TcR<sup>faible</sup> {Erlacher, Knoflach, et al. 2005}. Par ailleurs, une forte induction du TcR ou la présence de GC entraîne une atrophie thymique sans empêcher la maturation des thymocytes. Toutefois, la stimulation des thymocytes via le TcR/CD3 et l'exposition concomitante de ces cellules aux GC augmente l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et favorise leur survie, ce qui ultimement, préserve la cellularité de l'organe {Boldizsar, Palinkas, et al. 2003}; {Palinkas, Talaber, et al. 2008}. Cette situation crée une fenêtre de sélection (voir **Figure 12**) où seuls les thymocytes portant un TcR qui réagit avec une avidité moyenne pour le complexe Ag/CMH<sub>du soi</sub> peuvent poursuivre leur maturation {Vacchio & Ashwell 1997} {Vacchio, Lee, et al. 1999}.



**Figure 12 :** Concept d’antagonisme mutuel expliquant la sélection positive des thymocytes. Selon une idée élaborée par Zacharchuk (1990) et précisée par Vacchio (1994), lors de la sélection positive les thymocytes DP reçoivent deux signaux s’opposant, un premier provenant d’un contact entre le TcR et le CMH et un second via les GC et le GR. La balance des deux signaux permet aux cellules présentant un TcR d’avidité moyenne pour le CMH-peptide de poursuivre leur maturation.

Certaines études publiées ont montré des résultats controversés quant au rôle exact des GC dans la maturation des thymocytes. Le développement normal du répertoire de lymphocytes T a été observé à partir de cultures cellulaires de thymus fétal (FTOC) chez des souris déficientes en GR {Purton, Boyd, et al. 2000}. De plus, un répertoire normal de lymphocytes T a été démontré chez quelques souris  $GR^{-/-}$  ayant atteint l’âge adulte {Purton, Zhan, et al. 2002}.

Le Tableau 2 qui suit résume l'ensemble des études ayant pour sujet le rôle des GC dans la maturation des thymocytes :

Modèle	Observations	Référence
Stimulation thymocytes via anti-TcR/CD3 + GC	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ GC inhibe apoptose des thymocytes via TcR</li> <li>▪ Signalisation via TcR inhibe l'apoptose des thymocytes induite par GC</li> </ul>	{Zacharchuk, Mercep, et al. 1990}; {Iwata, Hanaoka, et al. 1991}
Souris transgénique GR anti-sens	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↓ cellularité thymus, surtout cellules DP</li> <li>▪ Répertoire cellules T matures restreint</li> </ul>	{King, Vacchio, et al. 1995}; {Lu, Yasutomo, et al. 2000}
Inhibiteur du GR	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↓ apoptose des cellules DP induite par l'anti-CD3</li> <li>▪ ↑ apoptose des cellules DP induite par anti-TcR</li> <li>▪ Inhibition de la sélection négative</li> </ul>	{Xue, Murdjeva, et al. 1996}; {Vaccchio, Papadopoulos, et al. 1994}
Inhibiteur de la synthèse de GC	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↓ cellules DP post-stimulation TcR</li> <li>▪ ↓ cellules DP dépend de l'engagement du TcR</li> <li>▪ ↓ cellules DP est proportionnel à la complexité des Ag présentés par CMH</li> </ul>	{Vaccchio, Papadopoulos, et al. 1994}; {King, Vaccchio, et al. 1995}; {Vaccchio & Ashwell 1997 #185}; {Vaccchio, Lee, et al. 1999}
Mutation du GR empêchant la dimérisation <i>Souris GR<sup>-/-</sup></i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Sous-populations de thymocytes normales</li> <li>▪ Développement normal des thymocytes</li> </ul>	{Reichardt, Kaestner, et al. 1998}; {Purton, Boyd, et al. 2000}

Tableau 2 : Études ayant pour objet le rôle des GC dans le développement des thymocytes, inspiré de Godfrey, Purton, et al. (2000).

#### 2.4.2.2 Lymphocytes T

Les GC influencent l'activité des lymphocytes T matures, réduisent leur prolifération et dans certains cas augmentent leur mortalité {Webster, Tonelli, et al. 2002}. L'influence des GC sur les lymphocytes T matures est tantôt négative, tantôt positive et dépend de l'état d'activation de la cellule et de leur concentration. Un des exemples le plus marquant du rôle essentiel des GC dans l'organisme est le contrôle de l'expansion clonale des lymphocytes T dans un modèle de suractivation du système immunitaire. Gonzalo et collaborateurs (1993) ont démontré que sans l'influence des GC produits naturellement par l'organisme, l'activation des lymphocytes T résultant de l'injection à des souris de l'entérotoxine B du staphylocoque (SEB), un superantigène, entraînait la mort de 100 % d'entre-elles {Gonzalo, Gonzalez-Garcia, et al. 1993}.

Le principal effet inhibiteur des GC sur les lymphocytes T matures, et le premier à avoir fait l'objet d'études exhaustives, a été la diminution de la production d'un facteur de croissance des lymphocytes T, défini plus tard comme étant l'IL-2 {Crabtree, Gillis, et al. 1980}. Reem et Yeh ont démontré que l'exposition des lymphocytes T activés au Dex diminue à la fois la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  et l'expression du récepteur à l'IL-2 {Reem & Yeh 1984}. Le mécanisme d'action des GC sur la production d'IL-2 implique la liaison de l'hormone au GR et la synthèse *de novo* de protéines {Redondo, Fresno, et al. 1988}. Les GC ne modifient pas la concentration intracellulaire des facteurs de transcriptions liant le promoteur de l'IL-2 (NF-AT, AP-1, AP-3, Oct-1 et NF- $\kappa$ B) {Granelli-Piperno, Nolan, et al. 1990}. Toutefois, l'interaction entre l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale du GR et les facteurs de transcription NF-AT ou AP-1 empêche leur liaison à l'ADN (voir section : **Transrépression**) {Northrop, Crabtree, et al. 1992}; {Vacca, Felli, et al. 1992}; {Paliogianni, Raptis, et al. 1993}.

Les GC perturbent aussi le signal d'activation transmis par le TcR selon des mécanismes génomiques et non-génomiques. Les GC favorisent l'expression de la protéine GILZ chez les lymphocytes T activés {Mittelstadt & Ashwell 2001}. GILZ diminue le signal d'activation du TcR transmis par la protéine Ras via une interaction protéine-protéine {Ayroldi, Zollo, et al. 2002}. Aussi, la sous-unité N-terminale de GILZ s'associe avec c-Fos et c-Jun et inhibe l'activité transcriptionnelle de AP-1 {Mittelstadt & Ashwell 2001}. De plus, GILZ forme un complexe avec NF- $\kappa$ B en s'associant aux sous-unités p65 ou p52 et inhibe la liaison à l'ADN du facteur de transcription en séquestrant NF- $\kappa$ B dans le noyau {Ayroldi, Migliorati, et al. 2001}. Récemment, il a été montré que GILZ était un médiateur indispensable de l'action anti-proliférative des GC sur les cellules T activées {Ayroldi, Zollo, et al. 2007}. L'action non-génomique des GC sur les événements précoces suivant la liaison du TcR est localisée à la membrane cellulaire. Ces hormones inhibent les premières étapes du signal transmis par le TcR telles l'induction d'un flux de Ca<sup>2+</sup>, la production d'inositol phosphate, et la phosphorylation de la phospholipase-C $\gamma$ 1 {Baus, Andris, et al. 1996}. Il a été observé que les GC relocalisaient les diverses protéines associées au TcR/CD3 en empêchant leur association à l'intérieur de radeaux lipidiques {Van Laethem, Baus, et al. 2001}; {Van Laethem, Liang, et al. 2003}.

Paradoxalement, à faible dose (10 nM) les GC augmentent le signal transmis par le TcR/CD3 en favorisant l'expression de la chaîne  $\zeta$  dans ce complexe tandis qu'à plus forte dose un défaut dans la distribution à la membrane de cette chaîne associée au CD3 fut observé {Nambiar, Enyedy, et al. 2001}. Bartis et collègues (2006) ont démontré qu'une forte concentration de Dex peut induire la phosphorylation de ZAP-70 via la protéine kinase p56Lck et le GR activé {Bartis, Boldizsar, et al. 2006}.

Un autre effet inhibiteur des GC sur la prolifération des lymphocytes T est relié à l'augmentation de l'expression de la protéine CTLA-4. Ce récepteur entre en compétition avec le CD28 pour lier les molécules de la famille B7 exprimées à la surface des CPA et transmet un signal diminuant la prolifération des cellules T {Xia, Gasser, et al. 1999}.

Paradoxalement, une concentration physiologique de Cort favorise la prolifération des splénocytes stimulés via un anti-TcR en augmentant l'expression du récepteur à l'IL-2 et du co-récepteur CD4 $^{+}$  à la surface des cellules T {Wieggers, Labeur, et al. 1995}; {Wieggers, Stec, et al. 2000}. Aussi, l'exposition de lymphocytes T naïfs au Cort préalablement à leur stimulation, augmente la densité de la chaîne  $\alpha$  de l'IL-2R et favorise par la suite, leur prolifération dans un milieu exempt en GC {Almawi, Melemedjian, et al. 1999}.

Les effets permissifs et suppressifs du Cort sur la prolifération *in vitro* des cellules T sont reliés à la densité cellulaire. En effet, la stimulation de la prolifération des lymphocytes T par les GC est visible durant les premières 72h lorsque leur concentration est égale ou supérieure à  $2 \times 10^5$  cellules/duit tandis qu'un effet inhibiteur est observé à une concentration inférieure. De plus, la production d'IL-2 est inhibée dans l'une ou l'autre des situations {Wieggers, Stec, et al. 2001}.

Dans certains conditions, les GC peuvent inhiber l'apoptose des lymphocytes T induite par l'activation cellulaire (AICD) via l'expression des protéines GILZ et GITR {Riccardi, Cifone, et al. 1999}. L'exposition de thymocytes et lymphocytes T périphériques au Dex induit GILZ qui protège ces cellules de l'apoptose reliée à l'activation cellulaire via le

CD3. La présence de GILZ bloque l'augmentation de l'expression de FasL (CD95L) à la membrane cellulaire lors de l'activation des lymphocytes T {D'Adamio, Zollo, et al. 1997}. Récemment, deux sites nGRE ont été identifiés dans le promoteur de CD95L {Baumann, Dostert, et al. 2005}. Conjointement, ces deux études permettent d'expliquer la manière dont les GC diminuent l'AICD. L'expression de GITR à la membrane des cellules T activées leur confère une protection contre l'AICD. GITR est une protéine transmembranaire de la famille des récepteurs à TNF qui a été caractérisée dans un hybridome de cellules T traitées au Dex et dont l'expression a été induite par l'activation cellulaire {Nocentini, Giunchi, et al. 1997}. La présence de l'homologue humain, AIRT (activation-induced TNF-family receptor) a été montrée à la surface de lymphocytes T activés {Kwon, Yu, et al. 1999}. GITR agit comme molécule de co-stimulation en favorisant la production d'IL-2, la prolifération et la survie cellulaire {Ronchetti, Zollo, et al. 2004}.

Les GC polarisent la sécrétion des cytokines par les cellules T matures en favorisant la production de molécules anti-inflammatoires de type Th2 telles l'IL-4 et l'IL-10 {Almawi & Melemedjian 2002}. En bloquant préférentiellement la synthèse de l'IL-12 par les monocytes/macrophages et cellules dendritiques, les GC favorisent le développement des lymphocytes T de types Th2. L'effet des GC sur la production d'IL-12 par les CPA est relié à l'action négative des GC sur les niveaux de phosphorylation de la protéine STAT-4 dont l'activité est essentielle pour permettre l'expression de cette cytokine. Parallèlement, les GC diminuent l'expression des chaînes  $\beta 1$  et  $\beta 2$  du récepteur à l'IL-12 à la surface des cellules T en inhibant la liaison de NF- $\kappa$ B au promoteur du gène ce qui diminue la production d'IFN- $\gamma$  {Hasko & Szabo 1999}. Contrairement à l'effet inhibiteur des GC sur l'activation de STAT-4 par l'IL-12, l'exposition des cellules T au Dex augmente la phosphorylation de STAT-4 et la production d'IL-10 lorsque ces cellules sont exposées à l'IFN- $\beta$ . Miyaura et Iwata ont démontré, dans un système de différentiation des cellules T CD4 $^{+}$  naïves en type Th1/Th2, que l'ajout de GC empêche l'apparition du type Th1 en diminuant la production d'IFN- $\gamma$  et la phosphorylation de la p38 MAPK {Miyaura & Iwata 2002}. La production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T est liée à l'activité du facteur de transcription T-bet. Liberman et collègues (2007) ont démontré que les GC diminuent

la liaison à l'ADN de T-bet via une interaction entre le GR activé et ce facteur de transcription {Liberman, Refojo, et al. 2007}. La protéine GILZ serait aussi impliquée puisque sa sur-expression dans un modèle de souris transgénique favorise le développement de lymphocyte T CD4<sup>+</sup> de type Th2, la production d'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 et l'expression des facteurs de transcription GATA-3 et STAT-6. Parallèlement, ces souris expriment moins le facteur de transcription T-bet et des niveaux réduits d'IFN-γ {Cannarile, Fallarino, et al. 2006}.

La modulation par les GC du profil de cytokines produites par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> n'est pas restreinte à cette sous-population. En effet, l'exposition de cellules CD8<sup>+</sup> au Dex provoque une augmentation de la production d'IL-10 ainsi qu'une diminution de la synthèse d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13. Cet effet nécessite la présence conjointe d'IL-4 dans le milieu de culture et de CPA. L'augmentation de la production d'IL-10 est associée à la présence d'un GRE au niveau du promoteur du gène de cette cytokine. La production d'IL-10 par les cellules T CD8<sup>+</sup> exposées au GC cause, par un mécanisme de rétro-inhibition, une diminution de l'expression de l'IL-2R et de la production d'IFN-γ {Richards, Fernandez, et al. 2000}.

#### 2.4.2.3 Autres cellules

L'activité immuno-régulatrice des GC ne se limite pas uniquement aux lymphocytes T. Toutefois, puisque cette revue de littérature s'intéresse à l'influence des GC sur les lymphocytes T et les thymocytes, le **Tableau 3** qui suit, résume les principaux effets des GC sur les autres cellules du système immunitaire.

Type cellulaire	Conséquences physiologiques	Références
Lymphocytes B	↑ apoptose des précurseurs immatures ↑ apoptose des cellules matures modulation de la sécrétion des Ac : ↑ production d'IgE	{Lill-Elghanian, Schwartz, et al. 2002} ; {Perandones, Illera, et al. 1993 #10} ; {Wu, Sarfati, et al. 1991}
Macrophage	↓ libération de cytokines pro-inflammatoires : TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 ↓ libération de NO ↓ libération de PGE <sub>2</sub>	{Joyce, Gimblett, et al. 2001} ; {Maridonneau-Parini, Errasfa, et al. 1989} ; {Masferrer, Seibert, et al. 1992}
PBMC	↑ expression de Fas/Fas ligand, apoptose ↓ libération de cytokines pro-inflammatoires : TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8	{Schmidt, Lugering, et al. 2001} ; {Joyce, Kloda, et al. 1997}
Granulocyte	↓ migration ↓ phagocytose ↑ survie cellulaire	{Goulding, Euzger, et al. 1998}, {Strickland, Kisich, et al. 2001}
Cellule dendritique	↓ maturation (baisse de l'expression du CD80, CD86) ↓ de la présentation des Ag ↑ apoptose ↓ production IL-1 $\beta$ et TNF- $\alpha$	{Verhoeven, Van Haarst, et al. 2000} ; {Brokaw, White, et al. 1998} ; {Sacedon, Vicente, et al. 1999}
Cellule NK	↓ de la cytotoxicité	{Gatti, Cavallo, et al. 1987}

Tableau 3 : Description des différents effets causés par les GC sur les principaux effecteurs de l'immunité.

### 3 Le phénomène de résistance aux glucocorticoïdes

La réduction de la sensibilité de divers types cellulaires à l'action suppressive des GC est un problème commun qui complique la gestion des pathologies inflammatoires chroniques. Les patients ayant développé une résistance aux GC souffrent d'une inflammation sévère caractérisée par des niveaux élevés de cytokines, de facteurs de croissance et de co-stimulation associés aux tissus {Leung, de Castro, et al. 1998}. Chez ces individus, les GC exercent un effet anti-inflammatoire en périphérie, tandis qu'une résistance à leur action a été observée localement au sein des zones inflammées {Kino & Chrousos 2002}. Il a été suggéré que certains signaux ou molécules présents localement et favorisant la réponse inflammatoire peuvent interférer avec l'effet inhibiteur des GC et diminuer leur potentiel immunosuppresseur.

### 3.1 Mécanismes de résistance

Les études portant sur la résistance aux GC ont fait état de divers mécanismes. Ces derniers ont été reliés à l'activité cellulaire, à des modifications au niveau de l'épissage alternatif du mRNA du GR, à la phosphorylation du récepteur par les MAPKs, à un défaut au niveau du recrutement de la protéine HDAC-2 et finalement à la synthèse de la protéine MIF (*macrophage inhibitory factor*). Les prochaines sections relateront les divers travaux ayant caractérisés ces mécanismes de résistance aux GC.

#### 3.1.1 Activité cellulaire

La stimulation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> via le CD3 et le CD28 simultanément confère à ces cellules une résistance à l'action des GC. Ce phénomène a été associé à une prolifération soutenue malgré une diminution de la production d'IL-2 {Nijhuis, Hinloopen, et al. 1994}. D'autre part, une plus grande sensibilité des cellules naïves (CD45RA+) à l'effet anti-prolifératif du Dex a été notée et suggère que la signalisation via le CD28 contribue à une meilleure résistance aux GC des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires (CD45RO+) {Nijhuis, Hinloopen, et al. 1995}. L'activation du CD28 favorise la survie des cellules exposées aux GC via la liaison de NF-κB à un élément de réponse au CD28 (CD28RE) dans le promoteur du gène de l'IL-2 {Wagner, Hagman, et al. 1996}.

Une autre voie de résistance aux GC a été reliée au signal transmis par l'IL-2R. En effet, l'ajout d'IL-2 exogène à une culture cellulaire de lymphocytes T stimulés avec de la PHA empêche l'effet anti-prolifératif de la prednisone et protège les cellules de Th1 de l'apoptose induite par les GC {Walker, Potter, et al. 1987}; {Zubiaga, Munoz, et al. 1992}. Le traitement de la lignée de lymphocytes T (HT-2) avec de l'IL-2 rend ces cellules résistantes aux GC en diminuant la translocation au noyau du GR. Dans ces cellules, le signal transmis par l'IL-2R active la protéine JAK-3 qui phosphoryle ensuite STAT5 et mène à la formation d'un complexe STAT5-GR retenu dans le cytoplasme {Goleva, Kisich, et al. 2002}; {Biola, Lefebvre, et al. 2001}.

Un autre modèle permettant une forte activation des lymphocytes T est l'entérotoxine B du staphylocoque (SEB). Cette molécule agit comme un superantigène en se fixant à l'extérieur de la niche peptidique du CMH<sub>II</sub> présent à la surface des APC. Les cellules T ayant un TcR composé d'un domaine variable spécifique ( $V_{\beta}8+$ ) sont activées par le complexe CMH-SEB et résistent à l'effet anti-prolifératif et à l'apoptose reliés aux GC {Weng, Zhao, et al. 1999}. *In vitro*, le pontage du CD28 à l'aide d'anticorps spécifiques rend les cellules T exposées au SEB réfractaires à l'effet anti-prolifératif du Dex. L'activation de ERK 1/2, la phosphorylation du GR et sa rétention dans le cytoplasme ont été observés. Ces événements corrèlent avec la résistance des cellules T au Dex {Li, Goleva, et al. 2004}. Le rôle des protéines MAPK MEK/ERK a été confirmé dans une autre étude. Dans celle-ci, la prolifération de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs stimulés à l'aide d'un anti-CD3 a été inhibée par la présence de Dex dans le milieu de culture via une diminution de l'activité transcriptionnelle des facteurs AP-1, NF-AT et NF-κB. Toutefois, l'ajout d'IL-2 ou d'une co-stimulation via le CD28 a empêché l'activité suppressive du Dex en favorisant une signalisation via les MAPKs {Tsitoura & Rothman 2004}.

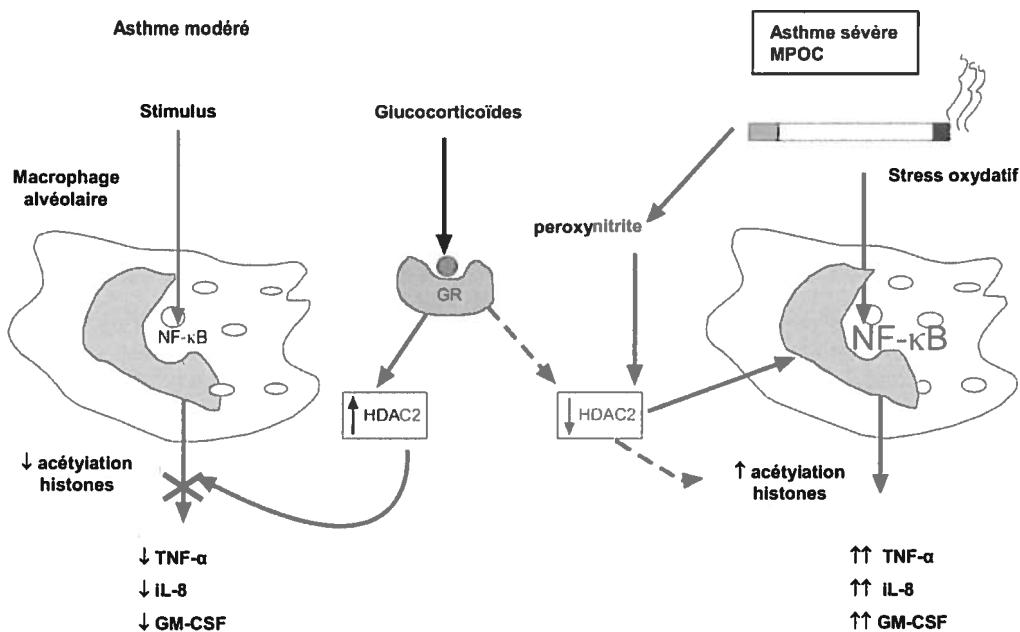
### 3.1.2 Phosphorylation du récepteur via les MAPkinases

Le GR est une phosphoprotéine dont le niveau de phosphorylation influence son transfert au noyau, l'interaction avec des co-facteurs et sa stabilité {Webster, Jewell, et al. 1997}; {Ismaili & Garabedian 2004}. Le groupe de Bodwell et collègues (1991) a identifié 7 sites potentiels de phosphorylation, tous présents dans la partie N-terminale du GR murin {Bodwell, Orti, et al. 1991}. Parmi ceux-ci, deux sites en position Ser<sup>224</sup> et Ser<sup>232</sup> correspondant aux sites en position Ser<sup>203</sup> et Ser<sup>211</sup> du GR humain deviennent hyperphosphorylés en présence de l'hormone {Krstic, Rogatsky, et al. 1997}. Des données recueillies lors d'études menées *in vitro* ont révélé que la phosphorylation du récepteur en position Ser<sup>203</sup> favorise sa présence dans le cytoplasme tandis que la forme phosphorylée en Ser<sup>211</sup> prédomine dans le noyau {Wang, Frederick, et al. 2002}. Au niveau fonctionnel, la phosphorylation du GR en Ser<sup>211</sup> par la p38 MAPK entraîne l'apoptose de cellules lymphoïdes exposées au Dex tandis que la phosphorylation du GR de rat en position Ser<sup>246</sup> par JNK empêche l'activité transcriptionnelle du récepteur

{Miller, Webb, et al. 2005}; {Rogatsky, Logan, et al. 1998}. Une diminution de l'activité transcriptionnelle du GR a été aussi observée chez des PBMC de patients asthmatiques exposés conjointement aux cytokines IL-2 et IL-4. *In vitro*, une perte de l'effet de stimulation du Dex sur la production d'IL-10 et la répression de l'expression du GM-CSF par ces cellules a été observé {Irusen, Matthews, et al. 2002}. Le site de phosphorylation inhibiteur du GR par le p38 MAPK se situe sur une sérine (non identifiée) dans le domaine de liaison au ligand entre les acides-aminés 525-795 {Szatmary, Garabedian, et al. 2004}.

### 3.1.3 HDAC-2

Certains patients asthmatiques sévères ou atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) développent une résistance aux corticostéroïdes. Le mécanisme impliqué dans cette baisse de sensibilité aux GC est relié à la diminution de l'expression et de l'activité des HDACs chez les PBMC et les macrophages alvéolaires {Hew, Bhavsar, et al. 2006}. Tel que mentionné plus haut, l'activité de HDAC-2 est nécessaire pour permettre la liaison du GR à p65 et ainsi inhiber la transcription de gènes sous le contrôle de NF- $\kappa$ B (voir section : **Transrépression**). La fumée de cigarette est une des principales causes de MPOC et le stress oxydatif qu'elle engendre a été démontré comme responsable de la diminution de l'expression de HDAC-2 via son ubiquitination, sa nitration ou sa phosphorylation. Une augmentation de la production d'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$  a été observée chez des macrophages alvéolaires isolés de patients atteints de MPOC qui affichent une résistance aux GC (voir **Figure 13**) {Ito, Lim, et al. 2001}.



**Figure 13 :** Rôle de HDAC-2 dans la perte de sensibilité aux GC. La fumée de cigarette diminue l’expression de la protéine HDAC-2 et par conséquent, baisse la désacétylation du GR. Une quantité réduite de GR désacétylé ne permet plus la répression de la transcription des gènes sous le contrôle de NF- $\kappa$ B et la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires, inspiré de Barnes (2006).

### 3.1.4 Compétition avec GR $\beta$

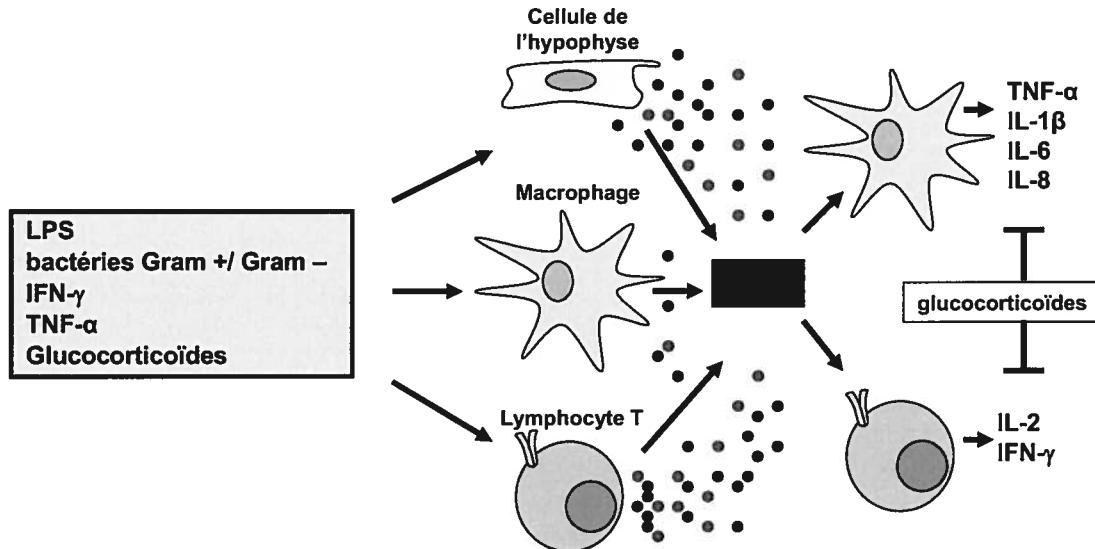
Tel que décrit plus haut, le GR $\beta$  est une forme tronquée du GR $\alpha$  et permet de réduire les effets génomiques reliés au GC dans une cellule en formant des hétérodimères inactifs. Les premières études cliniques portant sur le sujet ont été réalisées avec des PBMC isolés de patients asthmatiques résistants aux corticostéroïdes. Une perte de sensibilité aux GC reliée à une diminution de l’interaction GR :ADN a été notée chez ces cellules exposées *in vitro* à l’IL-2, l’IL-4 ou l’IL-13 {Spahn, Szeffler, et al. 1996}; {Leung, Hamid, et al. 1997}. De plus, une augmentation de l’expression GR $\beta$  a été montrée dans les lymphocytes T isolés de lavages bronchoalvéolaires de patients asthmatiques résistants aux corticostéroïdes ou présents sur des coupes histologiques prélevées de patients asthmatiques décédés {Hamid, Wenzel, et al. 1999}; {Christodoulopoulos, Leung, et al. 2000}. L’accumulation de GR $\beta$  et l’augmentation du ratio GR $\beta$  :GR $\alpha$  ont été observées dans divers types cellulaires suite à leur exposition au TNF- $\alpha$ , IL-1 ou IFN- $\gamma$  {Webster,

Oakley, et al. 2001}; {Tliba, Cidlowski, et al. 2006}. L'implication du GR $\beta$  dans la résistance aux GC a aussi été documentée dans d'autres pathologies inflammatoires. Ainsi, des travaux menés sur des patients atteints de colite ulcéreuse ont révélé que près de 83 % de ceux qui sont résistants au GC expriment la forme  $\beta$  du GR {Honda, Orii, et al. 2000}. De plus, une augmentation de l'infiltration d'éosinophiles et de lymphocytes T ayant des niveaux élevés de GR $\beta$  a été observé chez des personnes présentant une polyposie nasale et résistantes aux corticostéroïdes, {Hamilos, Leung, et al. 2001}. La présence d'IL-18 dans le sérum de patients atteints de maladie de Crohn corrèle avec l'augmentation de la forme GR $\beta$  dans les cellules T et diminue leur sensibilité aux GC {Towers, Naftali, et al. 2005}.

### **3.1.5 Influence du facteur inhibiteur de migration (MIF)**

Le facteur inhibiteur de migration MIF a été découvert dans les années 60 et initialement caractérisé comme une molécule soluble produite par les lymphocytes T activés qui diminue la migration des monocytes/macrophages {George & Vaughan 1962}. Ce facteur est associé à la réponse systémique au stress. La production de MIF par l'hypophyse et sa libération dans la circulation sanguine a été observée lors de l'activation de l'axe HPA. La production de MIF et des GC se fait parallèlement et ces deux molécules agissent de manière inverse sur de nombreuses cibles communes. MIF est une cytokine qui joue un rôle critique dans la cascade inflammatoire en augmentant le potentiel endotoxique du LPS et la mortalité {Bernhagen, Calandra, et al. 1993}. Outre la production de MIF au niveau systémique, les macrophages emmagasinent une quantité importante du facteur préformé et sa libération est favorisée par le LPS. De plus, une boucle d'amplification entre MIF et le TNF- $\alpha$  a été observée puisque ces deux cytokines favorisent leur sécrétion mutuelle {Calandra, Bernhagen, et al. 1994}. La production de MIF par les macrophages et les cellules T activées peut aussi être stimulée par une faible concentration de GC tandis qu'une concentration  $\geq 10^{-8}$  M inhibe complètement sa synthèse {Calandra, Bernhagen, et al. 1995}. Parallèlement, MIF stimulate l'activité des lymphocytes T puisque sa neutralisation diminue la prolifération de ces cellules et la production d'IL-2 {Bacher,

Metz, et al. 1996}. La Figure 14 qui suit représente le rôle central que joue MIF dans la réponse inflammatoire et la résistance aux GC.



**Figure 14 :** Mécanisme d'action de MIF au niveau cellulaire et son rôle dans la résistance aux GC. La production de MIF est systémique et locale. L'activation des macrophages et des lymphocytes T entraîne la sécrétion de MIF qui stimulate la production de cytokines pro-inflammatoires et la prolifération des lymphocytes T. La présence de concentrations élevées de MIF rend la réponse inflammatoire insensible à l'action inhibitrice des GC, inspiré de Baugh & Donnelly (2003).

La présence de MIF dans le milieu est synonyme de résistance aux GC {Baugh & Donnelly 2003}. La liaison de MIF à son récepteur, le CD74, une protéine transmembranaire de type II, active la PKA et la voie de signalisation ERK {Leng, Metz, et al. 2003}. Cette voie contrôle la phosphorylation de la PLA2 et la production d'acide arachidonique (précurseur des prostaglandines et leukotriènes) dont la synthèse est inhibée par les GC. MIF permet de soutenir la production de l'acide arachidonique par des fibroblastes activés même lorsque exposés au Dex {Mitchell, Metz, et al. 1999}. De plus, MIF inhibe la synthèse d'IkB chez des PBMC exposés au Dex. Ainsi, en bloquant la synthèse d'IkB, MIF favorise le transfert au noyau de NF- $\kappa$ B et la production de cytokines pro-inflammatoires {Daun & Cannon 2000}. MIF diminue aussi l'activité anti-inflammatoire des GC en influençant la synthèse de MKP-1. Roger et collaborateurs (2005) ont observé une production soutenue de TNF- $\alpha$  par des macrophages murins Raw264.7 et d'IL-8 par des cellules promonocytes humaines U937 exposés conjointement au MIF et au Dex. Dans ce modèle *in vitro*, la présence de MIF a empêché

l'expression de MKP-1 et a permis la production soit de TNF- $\alpha$  ou d'IL-8 {Roger, Chanson, et al. 2005}. Dans une autre étude, les auteurs ont remarqué que les macrophages péritonéaux provenant de souris MIF<sup>-/-</sup> expriment des niveaux plus élevés de MKP-1 et ont noté une réduction parallèle de la phosphorylation de la p38 MAPK {Aeberli, Yang, et al. 2006}. Parallèlement, une forte activité de la p38 MAPK est observée chez des patients atteints de colite ulcéreuse et résistants aux GC. La neutralisation de MIF chez ces patients diminue la production d'IL-8 par les cellules isolées de la lamina propria et restaure leur sensibilité aux GC {Ishiguro, Ohkawara, et al. 2006}.

#### **4. Le stress oxydatif**

Les ROS sont un sous-produit du métabolisme des cellules. La production systémique et intracellulaire de ROS est associée à divers effets négatifs caractérisant des situations pathophysiologiques telles : la réponse inflammatoire ou l'ischémie/reperfusion. Toutefois, dans certains systèmes la génération de ROS figure comme une étape dans diverses cascades de signalisation intracellulaire par exemple, celles des MAPKs menant à l'activation cellulaire, à l'expression de gènes ou à la prolifération {Davies 1995}. La section qui suit portera sur l'influence du stress oxydatif sur les fonctions des lymphocytes T, le rôle anti-oxydant du glutathion (GSH) et du système de transport  $x_c^-$ , et finalement exposera les bienfaits physiologiques et immunitaires des thérapies anti-oxydantes post-lésion thermique.

##### **4.1 Effets sur les lymphocytes T**

La stimulation des lymphocytes T à l'aide d'agents mitogéniques divers tels les lectines de plantes (PHA, Con-A), des superantigènes (MMTV, SEA, SEB) ou des anticorps dirigés soit contre le TcR ou le CD3 active une cascade de signalisation entraînant la production de radicaux libres {Sekkat, Dornand, et al. 1988}; {Williams & Henkart 1996}; {Hildeman, Mitchell, et al. 1999}. La balance intracellulaire entre molécules pro- et anti-oxydantes exerce une influence sur la production de cytokines, la prolifération et l'apoptose des lymphocytes T. En effet, une faible concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permet

l'activation du facteur de transcription NF-κB, la production d'IL-2 et la prolifération des cellules T {Los, Droege, et al. 1995}. Ceci suggère que la stimulation des lymphocytes T induit de manière intrinsèque la production de ROS et que leur concentration intracellulaire influence le devenir de ces cellules. Les travaux de Tatla et collaborateurs (1999) ont montré que les ROS produits lors de la stimulation des lymphocytes T agissent comme messagers secondaires en favorisant la production d'IL-2 et la prolifération cellulaire {Tatla, Woodhead, et al. 1999}. D'ailleurs, la stimulation de cellules T via le CD3 et le CD28 en présence de peroxyde d'hydrogène entraîne une forte phosphorylation des protéines de la famille des MAPKs {Hehner, Breitkreutz, et al. 2000}.

À l'inverse, une concentration trop élevée en ROS renverse ce phénomène {Flescher, Tripoli, et al. 1998}. La stimulation du TcR entraîne la génération de peroxyde d'hydrogène et d'ion superoxyde. Chacune de ces molécules est impliquée dans deux cascades de signalisation qui s'opposent. Il a été démontré que l'expression du Fas ligand, prédisposant la cellule T à l'apoptose, est dépendante de l'ion superoxyde tandis que le signal favorisant la prolifération cellulaire transmis par ERK est dépendant du peroxyde d'hydrogène {Devadas, Zaritskaya, et al. 2002}. La concentration en ROS oriente les fonctions des lymphocytes T. Tel que décrit plus haut, une faible concentration stimule la production d'IL-2, tandis qu'une forte dose de peroxyde d'hydrogène inhibe totalement l'expression de cette cytokine via une suppression de l'activité transcriptionnelle du facteur CREB {Rodriguez-Mora, Howe, et al. 2005}.

## **4.2 Mécanismes anti-oxydants**

### **4.2.1 Glutathion**

Le métabolisme des hydroperoxydes via le glutathion (GSH) et l'activité des enzymes GSH peroxydase et GSH réductase représente un mécanisme majeur de défense contre le stress oxydatif {Shan, Tan, et al. 1994}. Le GSH est un tripeptide ( $\gamma$ -glutamylcysteinoglycine) qui existe en équilibre sous sa forme oxydée (GSSG) ou réduite (GSH). Dans les cellules au repos, le rapport entre les formes réduites et oxydées du GSH est de 100 :1 (GSH : GSSG). Toutefois, l'activation des cellules, de même que leur

exposition à divers composés pro-oxydants tels les radicaux libres associés à la réaction d'inflammation, provoquent rapidement un changement dans le ratio GSG :GSSH {Asensi, Sastre, et al. 1999}. En réponse au stress, diverses réactions chimiques entraînent une consommation du GSH soit par sa conjugaison avec une variété de composés électrophiles ou par la formation de GSSH. Parallèlement, une cellule peut entretenir son pool intracellulaire de GSH via la synthèse *de novo* ou à travers la réduction enzymatique de la forme disulfide (GSSG) en utilisant le système GSH reductase/NADPH {Dickinson & Forman 2002}.

#### **4.2.1.1 Structure et synthèse**

La synthèse *de novo* du GSH implique deux réactions enzymatiques qui utilisent de l'ATP pour combiner les acides aminés glutamate, glycine et cystéine. Dans la première réaction, le glutamate et la cystéine sont combinés suite à l'action de l'enzyme Glutamate-cystéine ligase pour former le composé  $\gamma$ -glutamylcystéine. Dans une seconde réaction impliquant l'enzyme GSH synthétase, une glycine est ajoutée au dipeptide pour ainsi former du GSH {Meister & Anderson 1983}.

#### **4.2.1.2 Rôle au niveau des lymphocytes T**

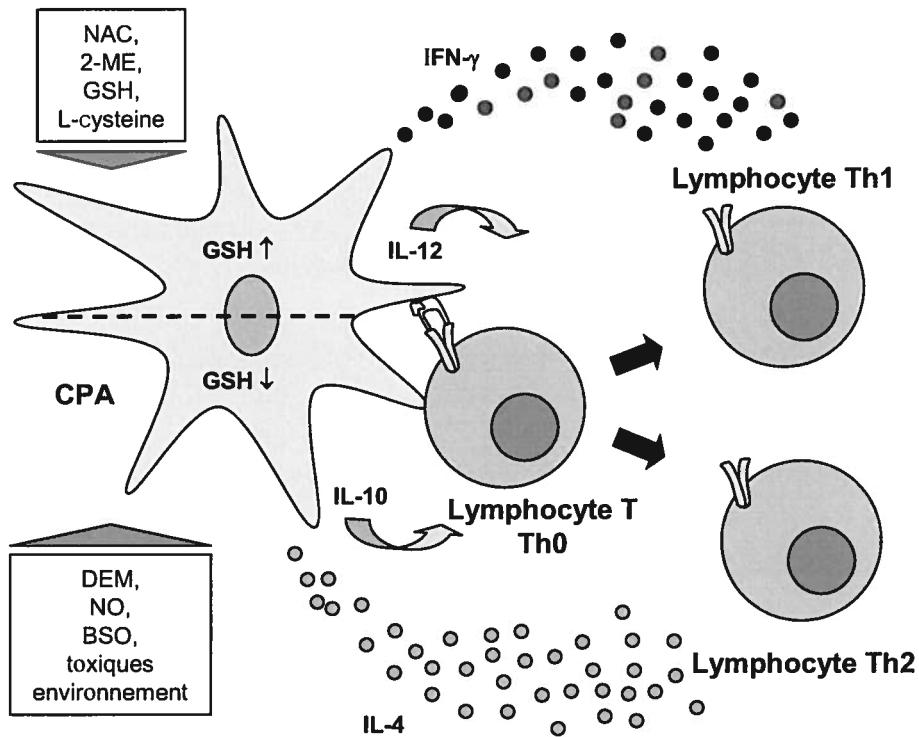
L'étude de Noelle et Lawrence (1981) a été la première à doser les niveaux intracellulaires de GSH lors de l'exposition de cellules T au O<sub>2</sub> et au 2-ME, des molécules pro- et anti-oxydantes {Noelle & Lawrence 1981}. La séparation des cellules selon leur contenu en GSH permet d'associer positivement la prolifération des lymphocytes T à leur niveau intracellulaire en GSH {Kavanagh, Grossmann, et al. 1990} ainsi qu'à une augmentation de l'expression de l'enzyme glutathion peroxydase, nécessaire à la synthèse du peptide {Arnold & Heinze 1990}. Parallèlement, d'autres travaux ont démontré qu'une faible diminution du pool intracellulaire de GSH influence négativement diverses fonctions des lymphocytes T soient : la progression du cycle cellulaire, la synthèse d'IL-2 et la cytotoxicité {Droge, Pottmeyer-Gerber, et al. 1986} ; {Liang, Lee, et al. 1989} ; {Suthanthiran, Anderson, et al. 1990}. Par ailleurs, Gmuder et collaborateurs (1990) ont

observé qu'une concentration intermédiaire de GSH est optimale pour permettre la synthèse d'ADN et la prolifération sans affecter l'expression du mRNA de l'IL-2 {Gmunder, Roth, et al. 1990}. Par contre, une dose excessive de GSH inhibe la synthèse d'IL-2 par les cellules T {Roth & Droege 1991}. La diminution du GSH intracellulaire affecte plus fortement les fonctions des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> que celles des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> {Gmunder & Droege 1991}

La concentration intracellulaire en thiols des CPA et des lymphocytes T influence le devenir des cellules T naïves en cellules effectrices de type Th1 ou Th2. Les premières études ciblant directement les lymphocytes T ont montré un lien positif entre le contenu cellulaire en thiols et le phénotype Th1. Ainsi, l'exposition de lymphocytes T naïfs (Th0) aux thiols (*N*-acétyl cystéine (NAC) ou GSH) diminue de manière dose-dépendante l'expression du mRNA de l'IL-4 et sa production, tout en ayant un effet positif sur la synthèse d'IL-2 et la prolifération {Jeannin, Delneste, et al. 1995}; {Eylar, Baez, et al. 1995}. Bengtsson et collaborateurs ont aussi observé une diminution de l'expression du CD30, associé au phénotype Th2, à la surface des lymphocytes T exposés au NAC ou au GSH {Bengtsson, Lundberg, et al. 2001}.

*In vivo*, ce sont les CPA qui exercent un rôle crucial dans le développement d'une réponse de type Th1 ou Th2. Il a été montré que les niveaux intracellulaires du tripeptide dans ces cellules peut orienter la différentiation des lymphocytes T auxiliaires naïfs en cellules Th1 ou Th2 (voir Figure 15) {Peterson, Herzenberg, et al. 1998}. Divers agents reconnus pour diminuer les niveaux de GSH (cyclophosphamide, diéthylmaléate (DEM), éthanol) ont été incorporés à la nourriture de souris. Des essais *in vitro* ont établi que les CPA issues de ces souris présentent une faible production d'IL-12 et favorisent le phénotype Th2. Les travaux de Nathens et collaborateurs (1998) ont confirmé ces résultats en utilisant cette fois un modèle de greffe de rein sur des souris C57bl/6 traitées au DEM. Ils ont montré que ces animaux présentent des niveaux réduits d'IFN- $\gamma$  et d'IL-2 et noté une prolongation du temps de survie du greffon {Nathens, Rotstein, et al. 1998}. Une réduction du GSH intracellulaire affecte le ratio GSH : GSSG et est associée à une baisse de la production d'IL-12 par les CPA. À l'inverse, lorsque des macrophages alvéolaires

sont exposés à l'IFN- $\gamma$ , une cytokine de type Th1, l'augmentation du ratio GSH : GSSG est noté {Dobashi, Aihara, et al. 2001}. Pour étudier le rôle de la balance intracellulaire en GSH dans l'établissement d'une réponse de type Th1 vs Th2, Murata et collaborateurs (2002) ont généré deux types de macrophages, oxydatifs et réducteurs, en exposant respectivement des cellules F4/80+ au DEM ou au NAC {Murata, Shimamura, et al. 2002}. Les macrophages réducteurs ayant un niveau intracellulaire de GSH élevé favorisent le développement de cellules Th1, via une augmentation de la production d'IL-12. À l'inverse, des macrophages oxydatifs influencent le développement de cellules Th2 via la production d'IL-10. Dans une autre étude, l'exposition de souris à divers toxiques de l'environnement tels le tributylétain (TBT), le benzophénone et le *p*-octylphenol mène à la réduction du GSH intracellulaire chez les CPA et favorise une forte polarisation de la réponse de type Th2. La restauration du pool intracellulaire de GSH via l'exposition de CPA au NAC augmente la production d'IL-12 et rebatit la réponse de type Th1 {Kato, Tada-Oikawa, et al. 2006}. De plus, l'injection d'un précurseur du GSH à un modèle de souris astmatique, augmente le ratio GSH : GSSG au niveau des poumons et réduit la production des cytokines de type Th2 : IL-4, IL-5 et IL-10 {Koike, Hisada, et al. 2007}.



**Figure 15 :** Effet de la balance intracellulaire en GSH chez les APC sur la différenciation des cellules T naïves en cellules de types Th1 ou Th2. Lorsque le contenu intracellulaire en GSH est élevé, la CPA libère de l'IL-12 qui favorise la différenciation des cellules T naïves en cellules de type Th1. À l'inverse, lorsque le contenu en GSH intracellulaire est diminué, la CPA produit de l'IL-10 qui entraîne la maturation des lymphocytes T en cellules de type Th2.

Tel que décrit plus haut, l'augmentation du pool intracellulaire en GSH favorise la réponse immunitaire de type Th1 et la production d'IL-12 par les CPA. Toutefois, certains résultats contradictoires ont été publiés et tendent à remettre en question le lien entre la concentration en thiols intracellulaire des CPA et la modulation des réponses de type Th1 ou Th2. L'exposition de cellules dendritiques dérivées à partir des PBMC au NAC diminue l'expression des molécules de co-stimulation (CD40, CD86, CMH<sub>H</sub>) et leur capacité d'activer des lymphocytes T naïfs {Verhasselt, Vanden Berghe, et al. 1999}. De plus, des cellules dendritiques exposées au NAC ou au GSH expriment des niveaux réduits de CD40 et produisent moins d'IL-12 {Iijima, Yanagawa, et al. 2003}. Aussi, Mazzeo et collaborateurs (2002) ont montré une diminution de la production d'IL-12 par des cellules THP-1 préalablement stimulées avec de l'IFN- $\gamma$ , lorsque exposées au GSH ou au NAC {Mazzeo, Sacco, et al. 2002}. Dans une autre étude, l'augmentation des thiols intracellulaires chez des splénocytes avant leur stimulation avec un anti-CD3 a favorisé la

production d'IL-4 et empêché la synthèse d'IFN- $\gamma$  induite par l'IL-12. Les CPA sont responsable de ce phénomène, puisque l'exposition des cellules T isolées au NAC n'a aucun effet sur la production d'IL-4 ou d'IFN- $\gamma$ . Pour expliquer leurs observations, Monick et collaborateurs (2003) ont proposé un modèle dans lequel l'augmentation du pool intracellulaire en thiols précédant leur stimulation inhibe à la fois la phosphorylation de STAT4 et de STAT6, reliée respectivement à la synthèse IFN- $\gamma$  et d'IL-4 par les lymphocytes T, et favorise chez ces cellules la production d'IL-4 via une augmentation de l'activité transcriptionnelle de AP-1 et de NFATc {Monick, Samavati, et al. 2003}.

Récemment, les travaux de Hadzic et collaborateurs (2005) ont montré qu'une concentration intracellulaire adéquate en thiols et indépendante du GSH est suffisante pour assurer les fonctions des lymphocytes T. En effet, des cellules T dont la voie de synthèse du GSH est inhibée parviennent à proliférer et à produire de l'IL-2 normalement suite à leur exposition à divers thiols : NAC, 2-ME ou L-cystéine. Somme toute, le GSH, tout comme divers autres thiols, exerce un rôle redondant et agit comme un facteur favorisant la prolifération et orientant les fonctions des lymphocytes T de manière directe ou indirecte via l'activité des CPA {Hadzic, Li, et al. 2005}.

#### **4.3 Transport des acides aminés**

Le transport des acides-aminés à travers la membrane plasmique est un processus essentiel utilisé par les cellules pour répondre à leurs besoins physiologiques. Les principales propriétés des divers systèmes qui assurent le transport des acides-aminés sont : la stéréo-spécificité, c'est-à-dire que les L-acides-aminés sont plus facilement transportés que les D-acides-aminés ; la faible spécificité des transporteurs, donc plusieurs acides aminés partageant certaines caractéristiques peuvent emprunter le même type de transporteur ; ainsi que la dépendance des systèmes de transport à l'établissement d'un potentiel de gradient de Na<sup>+</sup>. L'utilisation d'un même transporteur par deux acides aminés ou plus est dépendant des constantes d'association de chacun des acides aminés pour le transporteur ayant pour conséquence que ces acides-aminés agissent comme inhibiteur compétitif l'uns pour l'autre {Christensen & Henderson 1952}; {Christensen &

Riggs 1952}; {Christensen, Riggs, et al. 1952}. Dans cette revue de littérature il sera question d'un système de transport  $\text{Na}^+$ -indépendant spécifique permettant le transport du glutamate et de la cystine qui fut découvert par Bannai et Kitamura (1980). Ce transporteur caractérisé dans une étude ultérieure prit le nom de système  $x_c^-$  {Bannai, Christensen, et al. 1984}.

#### 4.3.1 Système $x_c^-$

Un équilibre existe entre la forme réduite et oxydée de la cystéine. Instable à pH physiologique, la cystéine est rapidement oxydée et forme des homodimères connus sous le nom de cystine. Malgré une faible concentration dans les fluides extracellulaires, la cystéine entre dans les cellules via le système de transport des petits acides-aminés ASC (Alanine, Serine, Cystéine) tandis que la cystine, la forme dominante dans les milieux aquueux comme le plasma, le milieu de culture cellulaire et les fluides biologiques, emprunte un système de transport spécifique appelé système  $x_c^-$  {Bannai & Tateishi 1986}. À l'intérieur des cellules, la cystine est rapidement réduite en cystéine et incorporée dans les protéines et le GSH. La cystéine est donc l'acide aminé limitant dans les réactions de synthèse du GSH et un lien existe entre l'activité du système  $x_c^-$  et les niveaux de GSH intracellulaire {Bannai & Ishii 1982}. L'activité du système  $x_c^-$  est bidirectionnelle et permet l'échange d'une cystine pour un glutamate {Bannai & Kitamura 1980}. Les concentrations intra- et extra-cellulaires de ces deux acides aminés influencent leur transport mutuel à travers la membrane {Ishii, Nakayama, et al. 1991}. Le système requiert la présence des chaînes CD98 et xCT qui s'associent pour former le transporteur actif {Gmunder, Eck, et al. 1991}; {Sato, Tamba, et al. 1999}. La plupart des cellules exigent une importation minime de cystine pour permettre la synthèse de protéine et la production de GSH. L'expression du système  $x_c^-$  est plutôt faible dans plusieurs types cellulaires dont les lymphocytes T. Contrairement aux cellules T, la présence de  $x_c^-$  a été observée chez des macrophages, les neutrophiles et plusieurs lignées tumorales {Ishii, Nakayama, et al. 1991}; {Sakakura, Sato, et al. 2007}; {Chung, Lyons, et al. 2005}. L'expression du système  $x_c^-$  dans diverses lignées tumorales suggère un rôle du transporteur dans la création d'un micro-environnement extracellulaire réducteur

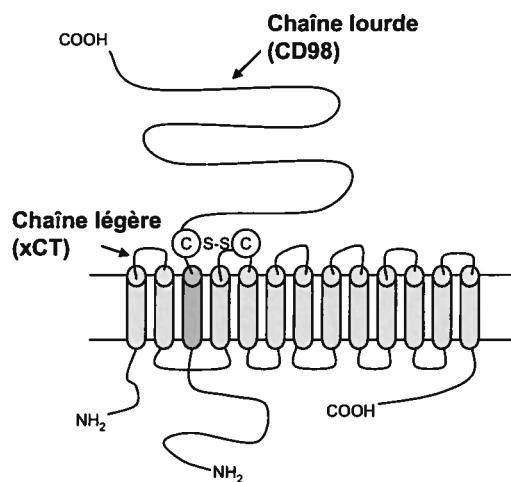
favorisant la viabilité et la prolifération cellulaire et constitue une nouvelle cible thérapeutique anti-tumorale {Banjac, Perisic, et al. 2008}. D'ailleurs, quelques études ont déjà démontré les bienfaits de l'utilisation de la sulfasalazine (SASP), un inhibiteur spécifique du système  $x_c^-$ , dans l'arrêt de la progression tumorale {Gout, Buckley, et al. 2001}; {Narang, Pauletti, et al. 2003}; {Chung, Lyons, et al. 2005}; {Doxsec, Gout, et al. 2007}.

#### 4.3.1.1 xCT

L'exposition de macrophages murins au LPS ou au DEM augmente l'activité du système  $x_c^-$  {Sato, Fujiwara, et al. 1995}. Cherchant à caractériser les composantes de ce transporteur, des chercheurs ont isolé l'ARNm de ces cellules et identifié une protéine qu'ils ont nommé xCT. Cette protéine révèle une homologie significative avec d'autres membres de la famille des sous-unités légères des transporteurs d'acides-aminoés hétéromériques (LSHAT) {Sato, Tamba, et al. 1999}. L'homologue humain du cDNA codant pour la protéine murine xCT, nommé SLC7A11 (solute carrier family 7, member 11), affiche une similarité de séquence de 93 %. À l'instar de son homologue murin, la protéine humaine xCT est localisée à la membrane plasmique, s'associe avec le CD98 et permet l'échange des acides aminés cystine et glutamate selon un ratio 1:1 {Bassi, Gasol, et al. 2001}. Les souris déficientes en xCT ( $xCT^{-/-}$ ) sont en santé et fertiles. Toutefois, on observe chez celles-ci des niveaux réduits en GSH plasmatique et inversement, une accumulation de cystine dans la circulation sanguine. De plus, des fibroblastes issus de ces souris ne survivent pas en culture cellulaire et l'ajout de 2-ME au milieu de culture préserve leur viabilité. *In vitro*, la mobilisation du calcium permet la progression du cycle cellulaire chez les fibroblastes activés. L'expression de xCT chez ces cellules diminue les besoins en  $\text{Ca}^{2+}$  et favorise le passage en phase S du cycle cellulaire via une augmentation de l'activité du facteur de transcription AP-1. L'expression de xCT contribue au maintien de la balance redox *in vivo*, mais devient indispensable *in vitro* pour assurer le maintien de certaines cultures cellulaires {Sato, Shiiya, et al. 2005}; {Lastro, Kourtidis, et al. 2008}.

#### 4.3.1.1.1 Structure

Les membres de la famille LSHAT sont des protéines à 12 passages transmembranaires qui s'associent via un pont disulfure aux chaînes lourdes 4F2hc (CD98) ou rBAT. La séquence du cDNA murin de xCT prédit une protéine de 502 acides aminés avec un poids de 55 kDa. Une cystéine située en position 158 est responsable de la formation du pont disulfure entre xCT et CD98 (voir **Figure 16**) {Sato, Tamba, et al. 1999}. Dans une autre étude menée à partir de cellules humaines du gliome U87 traitées au DEM, les auteurs ont observé une variante de xCT ayant une séquence de 495 acides-aminés et une homologie de 86 % avec la protéine murine. La différence se situe au niveau de l'extrémité C-terminale où la séquence de 22 acides aminés est remplacée par une séquence de 13 acides aminés résultant d'un épissage alternatif en 3' à un des 3 sites de polyadénylation {Sato, Tamba, et al. 1999}. De plus, des sites potentiels de phosphorylation dépendant de l'AMPc ou de la protéine kinase C localisés dans la portion intracellulaire ont été identifiés en position Thr45 et Thr103, respectivement {Kim, Kanai, et al. 2001}.



**Figure 16 :** Structure du système  $x_c$ - exprimé à la membrane cellulaire. Les chaînes lourde (CD98 ou 4F2hc) et légère (xCT) sont reliées l'une à l'autre via un pont disulfure.

#### **4.3.1.1.2 Distribution**

L'expression de xCT au niveau des tissus humains a été confirmée dans le cerveau, la moelle épinière, le pancréas {Kim, Kanai, et al. 2001}. Dans une étude parallèle, la présence du mRNA de xCT a été visualisée par RT-PCR chez la souris au niveau de la rate, des ovaires, des intestins et des reins et au niveau du pancréas chez l'humain {Bassi, Gasol, et al. 2001}. De récents travaux ont montré la présence de xCT au niveau des cellules de la bordure en brosse du duodénum et des reins ainsi que spécifiquement dans le cerveau au niveau des cellules gliales, des cellules endothéliales vasculaires et des méninges suggérant un rôle important du système  $x_c^-$  dans le maintien de la balance redox au niveau du liquide céphalorachidien {Burdo, Dargusch, et al. 2006}. La présence de xCT a aussi été observée dans diverses lignées cellulaire tumorales : D-54MG, STTG1, U-251MG (gliomes), CaCo-2 (colon), HepG2 (foie), A2780 (ovaire) {Chung, Lyons, et al. 2005}; {Bassi, Gasol, et al. 2001}; {Bridges, Kekuda, et al. 2001}; {Okuno, Sato, et al. 2003}. De plus, l'expression de xCT a été confirmée chez les cellules épithéliales de la rétine {Bridges, Kekuda, et al. 2001}, des macrophages murins et des neutrophiles humains activés {Sato, Kuriyama-Matsumura, et al. 2001}. L'activation de neutrophiles par le PMA ou le zymosan mène à la transcription du mRNA de xCT et conduit à une augmentation du transport de cystine à travers la membrane plasmique. La présence de xCT chez ces cellules favorise leur survie {Sakakura, Sato, et al. 2007}. Dans un modèle de choc septique, l'injection de LPS à des souris a augmenté le mRNA de xCT dans la rate et le thymus suggérant un rôle du transporteur dans le contrôle de la réponse inflammatoire {Taguchi, Tamba, et al. 2007}.

#### **4.3.1.1.3 Gène et régulation de l'expression**

L'activité du système  $x_c^-$  est favorisée par diverses molécules pro-oxydantes incluant le DEM, l'oxygène, les LPS bactériens et le peroxyde d'hydrogène. S'appuyant sur ces informations, Sato et collaborateurs (1999) démontrent que l'activité du système  $x_c^-$  était reliée à l'expression de xCT et que ces mêmes molécules influençaient directement sa transcription {Sato, Tamba, et al. 1999}. Dans une étude suivante, cette même équipe

identifia en 5' du gène de xCT un site de liaison pour le facteur de transcription NF-κB, 8 sites de liaisons pour AP-1 dont un qui jouxte un élément de réponse électrophile (EpRE) aussi appelé élément de réponse aux anti-oxydants (ARE). Les auteurs démontrent que l'exposition *in vitro* de macrophages péritonéaux à 1µg de LPS augmentait la liaison de NF-κB à son site de liaison présent en 5' du gène de xCT sans toutefois pouvoir relier de manière dose-dépendante la concentration en LPS utilisée et la quantité de NF-κB se liant au promoteur de xCT {Sato, Kuriyama-Matsumura, et al. 2001}. L'expression de xCT chez les macrophages murins fut reliée à l'activité du facteur de transcription Nrf2. Cette protéine favorise l'expression des gènes inducibles par le stress oxydatif tels que la glutathion-S-tranferase et la NADPH :quinone oxydoréductase. Le traitement de macrophages au DEM causa la liaison de Nrf2 au site EpRE présent en 5' du gène de xCT et fut relié en aval à la phosphorylation de la p38 MAPK {Ishii, Itoh, et al. 2000}. D'ailleurs, dans une autre étude, l'exposition de cellules de muscles lisses vasculaires au DEM généra des ROS ce qui activa la voie de la p38 MAPK et augmenta l'expression de xCT. La déprivation d'acides-aminés induit l'expression de différents gènes contrôlés par un élément de réponse aux acides-aminés (AARE). Deux copies de cet élément de réponse furent identifiées dans le promoteur de xCT et leur liaison conjointe par le facteur de transcription ATF-4 nécessaire à l'induction maximale du mRNA de xCT {Sato, Nomura, et al. 2004}.

#### 4.3.1.2 CD98

Le CD98, aussi appelé 4F2, appartient à un groupe de près de deux cent protéines exprimées à la membrane des leucocytes ayant divers rôles lors des réponses immunitaires tels : la migration, l'adhésion et la transduction de signaux menant à l'activation cellulaire {Deves & Boyd 2000}. Initialement découvert à la surface des lymphocytes T, le CD98 est exprimé par toutes les lignées cellulaires humaines testées et la plupart des cellules tumorales {Haynes, Hemler, et al. 1981}. Les premières études ont démontré un lien entre l'expression du CD98 et la prolifération cellulaire {Yagita, Masuko, et al. 1986}. Le CD98 est présent à la surface cellulaire en tant qu'un hétérodimère de 120 kDa composé d'une chaîne lourde de 80 kDa appelée CD98hc

(CD98 heavy chain), et d'une chaîne légère de 40 kDa. Six chaînes légères ont été identifiées (LAT-1, LAT-2, y<sup>+</sup>-LAT-1, y<sup>+</sup>-LAT-2, xCT, SPRM1) et partagent des similarités de structures qui leur permettent de s'associer au CD98hc via un lien disulfure en formant une variété d'hétérodimères et de s'ancrer à la surface cellulaire à travers 12 passages transmembranaires {Mastroberardino, Spindler, et al. 1998}. L'expression du CD98 au niveau des lymphocytes T, son association avec la protéine xCT et son rôle dans le transport de la cystine seront abordés dans les prochains paragraphes.

#### **4.3.1.2.1 Structure**

Chez l'humain, le cDNA du CD98hc code pour une protéine glycosylée de 529 acide aminés, contenant un domaine transmembranaire qui s'étend entre les acides aminés 83 à 106, une portion cytoplasmique de 423 acide aminés et un domaine intracellulaire de 82 acide aminés {Lumadue, Glick, et al. 1987}. Le CD98 est fortement conservé parmi les mammifères, le domaine transmembranaire y est similaire chez la souris tandis que la protéine complète fait 526 acide aminés et se divise en une portion cytoplasmique de 75 acide aminés et un domaine extracellulaire de 428 acide aminés {Parmacek, Karpinski, et al. 1989}. Le domaine carboxy-terminal contient 4 sites potentiels de glycosylation et les différences observées dans le patron de glycosylation expliquent les variations de poids observés entre lymphocyte T et B {Luscher, Rousseaux, et al. 1985}. La cystéine en position 109 participe à la formation du lien disulfure avec la chaîne légère {Torrents, Estevez, et al. 1998}.

#### **4.3.1.2.2 Gène et régulation de l'expression**

Le gène du CD98 est localisé sur le chromosome 11 et contient 9 exons. La portion 5' en amont du gène est riche en nucléotides G/C, hypométhylée, contient plusieurs sites de liaisons pour le facteur de transcription Sp1 et partage une homologie de séquence avec divers gènes inducible lors de l'activation des lymphocytes T incluant l'IL-2, la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2, le récepteur à transferrine, la thymidine kinase {Gottesdiener, Karpinski, et al. 1988}. L'expression du CD98 est différentielle entre les lymphocytes T

au repos et stimulés. Ainsi, l'activation des cellules T avec de la PHA, du calcium ionophore ou du TPA (phorbol ester) favorise l'expression du CD98. L'ajout d'EGTA aux cultures de cellules T stimulés bloque l'induction du CD98 démontrant ainsi que l'efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  est essentiel à l'augmentation de l'expression du CD98 {Leiden, Yang, et al. 1989}. Deux niveaux de régulation affectent l'expression du CD98hc. Un blocage dans la phase d'élongation du mRNA existe au niveau du premier exon/intron et le traitement des lymphocytes T au repos avec du PMA permet sa transcription. Le premier intron du gène du CD98hc contient un élément transcriptionnel actif dans la plupart des cellules T malignes. Cet élément agit en facilitant la transcription du mRNA et contient des sites de liaison pour les protéines nucléaires NF-4FA et NF-4FB ainsi qu'une séquence pour la liaison du facteur de transcription AP-1 {Karpinski, Yang, et al. 1989}. Ces trois séquences sont nécessaires pour l'expression maximale de CD98hc et l'ajout de calcium ionophore a un effet additif sur l'activité du promoteur {Lindsten, June, et al. 1988}.

#### **4.3.1.2.3 Fonctions au niveau des lymphocytes T**

La première étude cherchant à définir une fonction pour le CD98 chez les lymphocytes T a montré que sa liaison avec un anticorps spécifique inhibe leur prolifération dans la réaction lymphocytaire mixte ou suite à une stimulation avec l'IL-2 {Yagita, Masuko, et al. 1986}. Les auteurs de l'étude ont suggéré que le CD98 doit servir au transport d'un facteur de croissance ou entraîner une cascade intracellulaire contrôlant la prolifération. Le CD98 est faiblement exprimé chez les lymphocytes du sang périphérique et leur stimulation avec de la Con-A provoque son induction. L'expression de CD98 est augmentée chez les cellules T dès la 12<sup>e</sup> heure post-stimulation et un niveau maximal atteint vers la 36<sup>e</sup> heure. L'expression du CD98 précède l'entrée en phase G1 du cycle cellulaire et un blocage en phase G0 a été observé chez des lymphocytes T stimulés et traités avec un anti-CD98 {Yagita & Hashimoto 1986}. Des études supplémentaires ont révélé l'association du CD98 aux intégrines  $\beta_1$  à la surface des lymphocytes T, sa localisation membranaire dans des radeaux lipidiques et l'induction d'un signal intracellulaire impliquant la voie de la PI3-kinase {Warren, Patel, et al. 2000}; {Rintoul,

Buttery, et al. 2002}. Cette situation facilite l'agrégation des lymphocytes et favorise leur prolifération {Miyamoto, Mitchell, et al. 2003}.

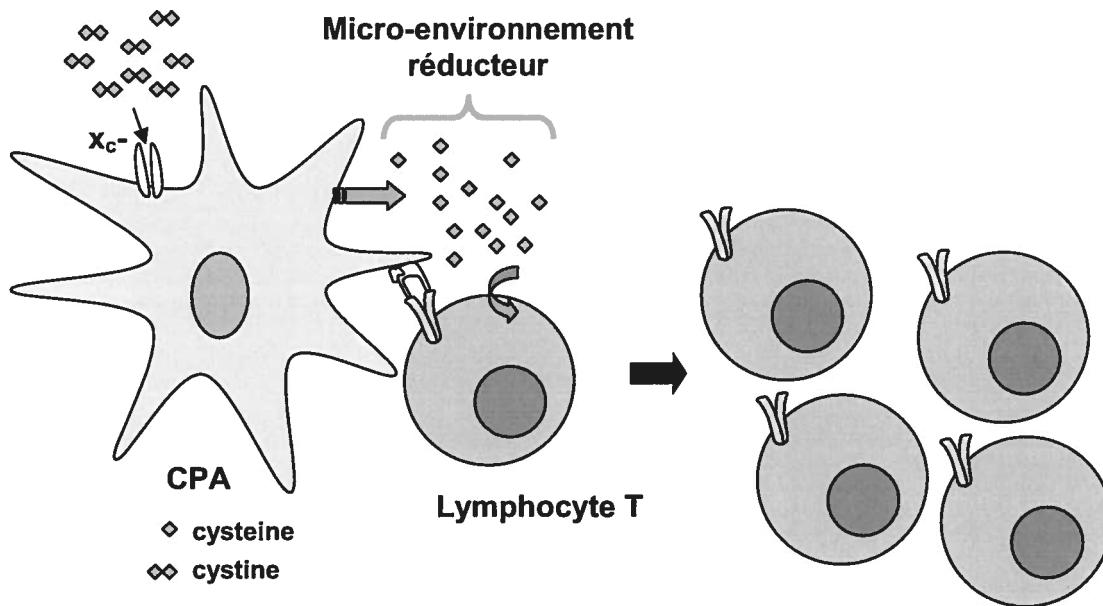
#### **4.4 Besoins anti-oxydants des lymphocytes T**

L'activation des lymphocytes T génère des radicaux libres et leur concentration intracellulaire influence plusieurs fonctions (voir section 4.1). Des études antérieures ont démontré le rôle des molécules anti-oxydantes, plus particulièrement les thiols, dans la croissance et la prolifération des cellules T suite à l'engagement du TcR {Droge, Mihm, et al. 1994}. Ainsi, un environnement riche en thiols est nécessaire pour permettre l'activation et la prolifération de PBMC stimulés {Iwata, Hori, et al. 1994}. L'appellation thiol ou mercaptan est utilisée en chimie organique pour définir tout composé qui contient un groupe fonctionnel sulphydryl (S-H). La cystéine est le thiol le plus simple et l'acide aminé à la base de la formation de thiols plus complexes. Puisque les lymphocytes T ne possèdent ni cystathionase, ni système  $\alpha_{c-}$ , la cystéine est donc un acide aminé essentiel {Eagle, Washington, et al. 1966}. La manière dont la cystéine est disponible pour ces cellules influence fortement leurs fonctions cellulaires {Droge, Eck, et al. 1991}

##### **4.4.1 *In Vivo***

L'activation des macrophages favorise le transport de cystine à l'intérieur de ces cellules et la libération de cystéine dans le milieu extracellulaire. Cette découverte fut le point de départ d'une série de travaux de recherche qui montrèrent que les CPA peuvent subvenir aux besoins en cystéine des lymphocytes T {Watanabe & Bannai 1987}. L'importation de cystine et la libération subséquente de cystéine dans l'espace extracellulaire ont été notées chez des monocytes et des fibroblastes. Dans cette étude, les auteurs ont montré une diminution du transport cystine/cystéine par l'exposition des cellules au glutamate {Eck & Droge 1989}. La production de cystéine par les macrophages est un élément qui influence le contenu intracellulaire en GSH des lymphocytes T et de ce fait, joue un rôle immunomodulateur {Gmunder, Eck, et al. 1990}; {Droge, Eck, et al. 1991}. L'étude d'Angelini et collègues (2002) a révélé l'importance du contact entre une CPA, en

l'occurrence, les cellules dendritiques et les lymphocytes T dans la libération par les CPA de thiols et l'établissement d'un micro-environnement réducteur entre les deux cellules {Angelini, Gardella, et al. 2002}. La cystéine présente sous sa forme réduite est utilisée par les lymphocytes T et favorise leurs fonctions. En outre, la production de thiols par une cellule dendritique augmente lors de sa maturation élicitée soit par l'exposition des cellules au TNF- $\alpha$ , au LPS ou la liaison du CD40 et devient maximale suite au contact avec un lymphocyte T. Edinger et Thompson (2002) ont établi un concept à travers lequel une CPA contrôle l'activation, la synthèse de protéine et la prolifération des lymphocytes si et seulement si la sécrétion de cystéine est suffisante pour le permettre (voir **Figure 17**) {Edinger & Thompson 2002}. L'inhibition du système  $x_c^-$  soit par la SASP ou un excès de glutamate dans le milieu de culture diminue fortement la libération de cystéine par la CPA et parallèlement l'activation et la prolifération des lymphocytes T.

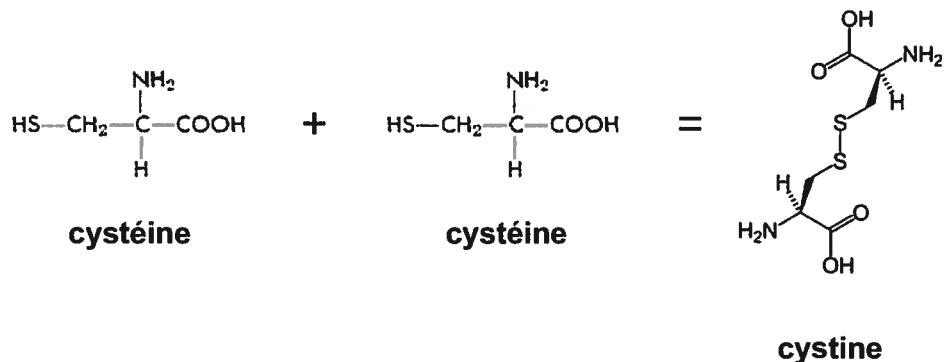


**Figure 17:** La sécrétion de cystéine par les CPA activées crée un micro-environnement réducteur dans la jonction immunitaire et favorise la prolifération des lymphocytes T, tiré de Edinger & Thompson (2002).

#### **4.4.2 *In Vitro* – Rôle du 2-Mercaptoethanol**

Les premières études ayant pour but la compréhension des étapes menant à l'activation et à la prolifération des cellules T étaient limitées par le nombre peu élevé de lymphocytes spécifiques à un antigène particulier. Pour palier à ce problème, les chercheurs ont tenté d'identifier des substances permettant une activation non-spécifique de ces cellules. Parmi celles-ci, le 2-ME s'est avéré particulièrement efficace lorsque incorporé au milieu de culture cellulaire {Broome & Jeng 1973}. L'utilisation du 2-ME en culture cellulaire : A) est essentiel à l'établissement de lignées cellulaire murine de lymphome, B) augmente la synthèse d'ADN et la division cellulaire des lymphocytes T stimulés avec divers agents mitogéniques (CON-A, PHA) et C) permet de remplacer de manière fonctionnelle les CPA dans les cultures mixtes de lymphocytes {Heber-Katz & Click 1972}; {Chen & Hirsch 1972}. Aujourd'hui, l'incorporation routinière de 50 $\mu$ M de 2-ME dans nos milieux de culture est basée sur une découverte de Goodman et Weigle (1977) qui ont montré que cette dose est optimale pour favoriser la prolifération des lymphocytes T isolés {Goodman & Weigle 1977}. Parmi divers composés contenant 1 ou des groupements thiols (2-ME, dithiothreitol (DTT), L-cysteine, alpha-thioglycerol, cystéamine, glutathion (GSH), sodium thioglycollate) qui démontrent leur efficacité à stimuler la prolifération de lymphocytes T de souris, le 2-ME est celui dont l'effet est le plus prononcé {Ohmori & Yamamoto 1981}.

Le 2-ME est un composé de formule chimique C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS. La présence d'un groupement sulfidryl (-SH) lui permet de cliver les liens disulfures et donc de dénaturer les protéines. C'est cette propriété qui a inspiré l'étude d'Ishii et collègues (1981) dans laquelle le mécanisme d'action du 2-ME sur les lymphocytes T a été identifié. Au pH physiologique (fluide extracellulaire et milieu de culture), l'acide aminé cystéine est instable, il s'oxyde et se conjugue à lui-même pour former une molécule de L-cystine (voir **Figure 18**) {Ishii, Bannai, et al. 1981}.

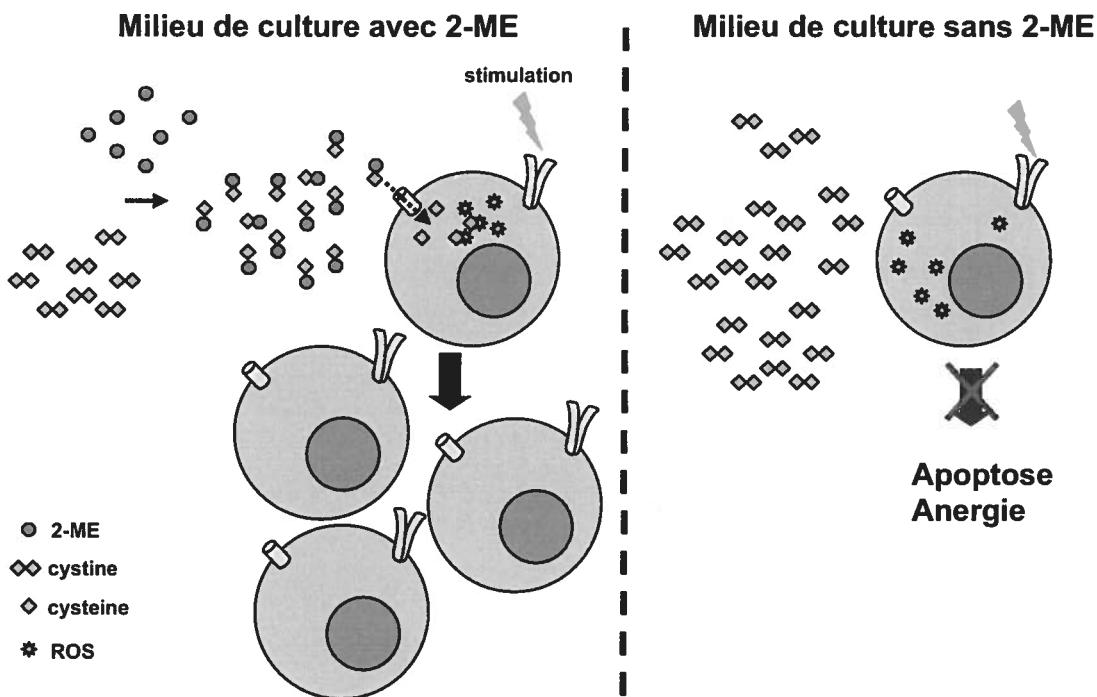


**Figure 18 :** Structure de la cystine.

Tel que démontré précédemment, les cellules T n’expriment pas constitutivement de système de transport permettant l’entrée de cystine et sont donc dépendantes de la cystéine libérée par les CPA dans le micro-environnement réducteur de la jonction immunitaire. Ainsi, l’utilisation du 2-ME en culture cellulaire favorise l’entrée de cystéine dans les cellules T via la formation de disulfides mixtes Cys-(2-ME) qui empruntent un système de transport différent (Leucine-Phénylalanine) exprimé par les lymphocytes T (voir **Figure 19**) {Ohmori & Yamamoto 1983}.

L’entrée de cystéine favorisée par le 2-ME permet la transition du cycle cellulaire de la phase G0 à G1 et mène à la division {Sugama, Namba, et al. 1987}. Ceci a été confirmé dans un modèle *in vitro* de stress oxydatif utilisant des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) stimulées au PHA et exposées au O<sub>2</sub>. Le 2-ME ajouté au milieu de culture a eu un effet cyto-protecteur et a assuré la transition de la phase G0 à G1 {Gougerot-Pocidalo, Fay, et al. 1988}. L’effet du 2-ME sur les lymphocytes T n’est pas directement relié à une augmentation de la production d’IL-2, du nombre de récepteurs pour cette cytokine ni d’un changement de l’affinité du récepteur pour l’IL-2, mais plutôt à une translocation de la PKC du cytoplasme à la membrane {Obiri & Pruett 1988}; {Fong & Makinodan 1989}. Les travaux de Messina et Lawrence (1992) effectués *in vitro* avec des PBMC humains et des cellules T murines ont montré qu’une dose optimale de cystine se situant entre 25 et 200μM augmente leur prolifération en réponse à divers mitogènes (Con-A et PHA). Toutefois, les auteurs ont aussi noté que le 2-ME augmente la prolifération des cellules T murines, peu importe la concentration environnante de

cystine ce qui est tout autre chez les lymphocytes T humains où cet effet n'est visible qu'à des doses sub-optimales de cystine. De plus, en exposant les cellules au BSO, un inhibiteur de la synthèse de GSH, les mêmes auteurs ont montré que le 2-ME permet à ces cellules de proliférer, suggérant ainsi que la balance intracellulaire entre besoins d'une cellule et disponibilité de thiols contrôle la prolifération cellulaire {Messina & Lawrence 1992}. Les besoins énergétiques d'une cellule augmentent sous l'effet de la stimulation, le 2-ME permet aux lymphocytes T stimulés d'accroître l'activité de diverses enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire telles : glutamate déshydrogénase, glutamate-pyruvate transaminase, malate déshydrogénase, isocitrate déshydrogénase, lactate déshydrogénase et pyruvate kinase {Aidoo, Feuers, et al. 1996}.



**Figure 19:** La stimulation des lymphocytes T génère des radicaux libres intracellulaires. L'accumulation des radicaux libre entraîne un arrêt de la division cellulaire et l'apoptose des cellules. Le 2-ME ajouté au milieu de culture permet la prolifération (*in vitro*) des lymphocytes T isolés via la formation de dimères 2ME-cystéine.

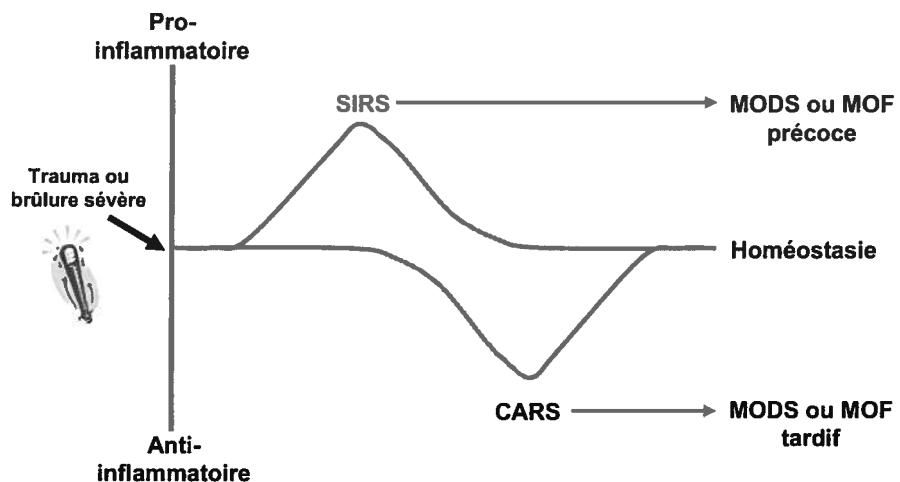
## 5. Le traumatisme de la brûlure

Les brûlures sévères sont une cause majeure de mortalité et de morbidité et près de 80 % des décès des grands-brûlés ayant survécu au traumatisme initial sont attribués à une septicémie ou au syndrome de dysfonction d'organe multiple (MODS). Les voies respiratoires sont la principale porte d'entrée d'où originent les infections affectant les grands-brûlés et près de 50 % des décès y sont attribuables (Church, Elsayed et al. 2006). L'infection des plaies est une source moins importante de septicémie chez ces patients avec seulement 10 % des décès qui y sont reliés. Les traumatismes, particulièrement ceux reliés aux brûlures déstabilisent les mécanismes de défense de l'hôte contre les microorganismes. L'immunosuppression qui survient en période post-brûlure augmente la susceptibilité aux infections de pathogènes communs et opportunistes {O'Sullivan & O'Connor 1997}. Cet état contribue au développement de septicémie et au MODS. Une réponse inflammatoire localisée et spécifique s'avère bénéfique dans le combat contre l'infection et favorise la guérison. Toutefois, dans le contexte de la brûlure sévère un état d'inflammation généralisée est observé. Le terme SIRS fut adopté par en 1991 par la *Society of Critical Care Medicine* pour définir cette situation et est caractérisé par la présence d'au moins deux critères cliniques parmi les suivants :

- température du corps  $> 38^{\circ}\text{C}$  ou  $< 36^{\circ}\text{C}$
- tachycardie  $> 90$  battements/minute
- respirations/minute  $> 20$  ou pression artérielle en  $\text{CO}_2 < 32 \text{ mmHg}$
- leucocytose  $> 12000/\text{mm}^3$  sang ou leucopénie  $< 4000/\text{mm}^3$  sang ou  $> 10\%$  neutrophiles, granulocytes immatures {Miller, Rashid, et al. 2007}.

Selon la théorie « two hit », deux insultes influencent la réponse immunitaire. La brûlure sévère représente cette première insulte et le SRIS est le résultat d'une sensibilisation généralisée du système immunitaire en réponse au traumatisme. Cette première insulte est caractérisée par l'activation inappropriée du système du complément, des lymphocytes T et macrophages, la production excessive de cytokines (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10), prostaglandines, leukotriènes, thromboxanes, l'augmentation de l'adhésion cellulaire des

cellules inflammatoires et de leur séquestration dans les organes. L'organisme résout l'inflammation en diminuant progressivement la synthèse de molécules pro-inflammatoires causant un syndrome de la réponse anti-inflammatoire (CARS). L'équilibre des réponses SIRS et CARS est essentiel dans la récupération de l'homéostasie générale des fonctions de l'organisme (voir **Figure 20**). La seconde insulte survient lors d'une réactivation du système immunitaire faisant suite à une infection. Celle-ci entraîne une endotoxémie et une activation systémique des cellules inflammatoires. À nouveau un SIRS peut réapparaître, cette fois-ci, la réponse anti-inflammatoire ne réussit pas à le contre-balancer. Des complications mènent à une détérioration de l'état des grands-brûlés et augmentent leur mortalité {Keel & Trentz 2005}.



**Figure 20 :** Modèle de la réponse inflammatoire post-trauma. La brûlure sévère entraîne une réponse inflammatoire systémique dans les premiers jours suivant l'admission du patient à l'unité de soins des grands-brûlés. Pour assurer un retour à l'homéostasie, l'organisme libère des médiateurs de la réponse anti-inflammatoire dont la production excessive peut entraîner une dysfonction multiple des organes, adapté de Miller, Rashid, *et al.* (2007).

## 5.1 Changements physiologiques

La brûlure sévère entraîne une réponse métabolique de type biphasique. Durant les premiers jours suivant le traumatisme, on observe une diminution du volume sanguin, de la perfusion des tissus situés en périphérie de même qu'une faible consommation d'oxygène. La phase initiale de l'inflammation, dite aiguë, est caractérisée par l'activation

locale et systémique de cellules et médiateurs solubles. L'activation des leucocytes cause la production et la libération d'IL-1, de TNF- $\alpha$ , d'IL-6 et du facteur stimulant des hépatocytes (HSF). Ces cytokines stimulent la production de protéines de phase aiguë, un groupe de molécules synthétisées par le foie, dont la concentration plasmatique augmente en réponse aux traumatismes. Cette classe de protéines comprend la protéine C-réactive, l'alpha-1 glycoprotéine, le fibrinogène, l'haptoglobine et l'alpha<sub>2</sub>-macroglobuline {Sevaljevic, Petrovic, et al. 1989}; {Kataranovski, Kataranovski, et al. 1998}. La phase aiguë est d'une durée de 10 jours. La seconde phase, plus longue, s'achève au-delà de la guérison des plaies. Celle-ci est caractérisée par une perte de poids importante, un hypermétabolisme cellulaire, le catabolisme des graisses et des protéines, une augmentation de la consommation d'oxygène et une dépense énergétique importante qui affectent sérieusement les grands-brûlés {Tredget & Yu 1992}; {Wolfe, Jahoor, et al. 1989}. Les médiateurs qui sont responsables de ces changements métaboliques entraînent aussi une résistance à l'insuline, un phénomène complexe qui survient à la fois en périphérie (muscles) et au niveau hépatique. Diverses hormones (glucagon, cortisol, catécholamines) et cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6) relâchées lors de la phase initiale de la brûlure sévère agissent directement au sein de ces deux tissus pour diminuer l'expression en surface du transporteur à glucose GLUT-4 {Cree & Wolfe 2007}. Une mauvaise utilisation du glucose par les cellules de l'organisme cause une hyperglycémie accentuée par la gluconéogénèse, soit la production de glucose par les cellules hépatiques via le catabolisme des graisses et des protéines. Le tissu musculaire constitue le principal réservoir d'acides aminés dans l'organisme. Les GC, le glucagon, les catécholamines, de même que les cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-1 sont les principaux médiateurs responsables de la protéolyse musculaire {Hasselgren 2000}. Ce processus est d'une importance telle que près de 20 % des protéines totales de l'organisme sont catabolisées dans les 2 premières semaines suivant ce traumatisme {Wolfe, Jahoor, et al. 1989}. La majorité des protéines musculaires sont dégradées par la voie protéolytique ubiquitine-protéasome-dépendante et de nombreuses études menées sur divers modèles de brûlure sévère ont démontré une augmentation de l'activité de ce système {Fang, Tiao, et al. 1995}; {Fang, Li, et al. 2000}; {Chai, Wu, et al. 2002}; {Tan, Wang, et al. 2003}.

L'intégrité de la barrière gastro-intestinale est sévèrement touchée lors d'un traumatisme. Normalement, le tractus gastro-intestinal est une barrière imperméable aux microorganismes. Cette barrière est formée par l'association de trois composantes : une barrière physique, la muqueuse intestinale ; une barrière immunologique et cellulaire, formée d'entérocytes, de plaques de Peyer et des IgA sécrétoire ; finalement une flore microbienne endogène au tractus qui maintient les populations potentiellement pathogènes à des niveaux sécuritaires {Epstein, Banducci, et al. 1992}. L'augmentation de la perméabilité de la barrière gastro-intestinale a été observée entre le jour 1 et 14 post-brûlure {Deitch 1990}; {Epstein, Tchervenkov, et al. 1991}. Il a été montré que l'étendue de la brûlure influençait la perméabilité du tractus gastro-intestinal. {Gianotti, Alexander, et al. 1993}. Ceci est causé par la production et la libération massive de radicaux libres par les neutrophiles et entérocytes qui modifient l'intégrité de la muqueuse intestinale et permettent le passage (translocation) des endotoxines et bactéries vers la circulation sanguine {Koike, Moore, et al. 1993}. L'inhibition pharmacologique de l'enzyme inducible NO synthétase (iNOS) ou de l'IL-6 et du LPS à l'aide d'anticorps neutralisants diminue la translocation bactérienne dans divers modèles de brûlure {Gennari & Alexander 1995}; {Gianotti, Braga, et al. 1996}; {Chen, Hsu, et al. 1998}. Les principales conséquences physiologiques causées par la brûlure sévère sont rapportées dans le tableau qui suit.

Dommages causés par la brûlure	Conséquences physiologiques	Références
Perte de l'intégrité de la peau	Production de ROS et RNS, ↑ de l'activité de la xanthine oxydase (XO), défaut au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale	{Chan & Murphy 2003}
Inflammation	Activation des phagocytes et enzymes pro-inflammatoires	{Wagner & Roth 1999}
Immunosuppression	Susceptibilité aux infections bactériennes et virales, choc septique	{O'Sullivan & O'Connor 1997}
Altérations au niveau de la coagulation : hypercoagulation, thrombose, ischémie/ reperfusion	Libération des ions métalliques, production de radicaux libres (ROS et RNS), diminution des défenses anti-oxydantes	{Harris & Gelfand 1995}
Stress	Augmentation de l'activité de l'axe HPA	{Matsui, Kudo, et al. 1991}

Tableau 4 : Principales conséquences physiologiques observées chez les grands-brûlés

## 5.2 La réponse associée aux hormones de stress

Les blessures par brûlures sévères sont associées à un débalancement général du système endocrinien affectant entre autre la production d'hormones de stress par les glandes surrénales {Matsui, Kudo, et al. 1991}. L'augmentation de la production de Cort est visible dès les premières heures suivant la brûlure et sa concentration demeure élevée dans la circulation des patients brûlés sur un période de temps pouvant aller jusqu'à 60 jours post-trauma {Parker & Baxter 1985}. La sécrétion de Cort par les glandes surrénales est contrôlée par l'hormone ACTH. Le stress initial relié au traumatisme de la brûlure augmente la sécrétion de CRH et d'ACTH dont les niveaux atteignent un maximum au jour 1 post-brûlure {Murton, Tan, et al. 1998}. Tandis qu'un lien direct existe entre l'intensité ou l'étendue de la brûlure et la sécrétion de Cort, les niveaux d'ACTH, quoique plus élevés durant les premières heures post-trauma chez les grands-brûlés, ne suivent pas ce patron de sécrétion {Vaughan, Becker, et al. 1982}. Les résultats d'expériences menées à partir de modèles de brûlure utilisant des rongeurs ont montré une augmentation de la concentration plasmatique en Cort limitée aux premiers jours post-trauma {D'Elia, Patenaude, et al. 2005}; {Leon, Blaha, et al. 2006}. Dans ce même modèle, la surimposition d'une septicémie a favorisé des niveaux élevés et soutenus de Cort et mené au décès de l'animal {Minei, Fong, et al. 1989}. L'augmentation de la concentration de Cort via l'implantation chirurgicale d'une pompe osmotique à des rats brûlés a favorisé la translocation bactérienne et la mortalité de ces animaux {Jones, Minei, et al. 1990}. Outre l'importante production de Cort, deux facteurs ont pour effet d'augmenter sa concentration dans la circulation sanguine, soit un défaut de rétro-inhibition de l'axe HPA et la chute des niveaux de son transporteur spécifique, la CBG. Ensemble, ces deux éléments sont responsables des niveaux élevés de Cort libre, biologiquement actif, mesurés dans la circulation sanguine des grands-brûlés. La perte de sensibilité au Cort dans les hépatocytes est causée par une diminution de l'expression du GR suite à l'action des cytokines pro-inflammatoires libérées massivement en réponse à la brûlure{Liu, Su, et al. 2002}. Parmi celles-ci, l'IL-6 est aussi responsable de la diminution de production de CBG par les hépatocytes et une relation inverse a été

observée entre la concentration plasmatique de cette protéine et les niveaux d'IL-6 {Garrel, 1996} ; {Emptoz-Bonneton, Crave, Lejeune et al. 1997}.

Les principaux rôles physiologiques des GC lors de la brûlure sévère sont d'assurer l'homéostasie électrolytique et de contrôler : la pression sanguine en agissant sur la vasoconstriction des vaisseaux sanguins, la respiration, l'activité des muscles squelettiques ainsi que la réponse inflammatoire et immunitaire {Sapolsky, Romero, et al. 2000}.

Les GC exercent un double rôle sur le système immunitaire, tantôt bénéfique, tantôt immunosuppressif. Le Cort est reconnu pour diminuer l'inflammation en affectant l'activité des macrophages, c'est-à-dire en diminuant la libération de médiateurs pro-inflammatoires tels le NO, PGE<sub>2</sub> et les cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et *granulocyte/macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) {Attur, Patel, et al. 2000}. De plus, chez des patients ayant développé une septicémie, le taux de survie est supérieur parmi ceux dont les niveaux de GC sont les plus élevés {Schroeder, Wickers, et al. 2001}. En accord avec cette observation, une insuffisance des glandes surrénales a été vérifiée chez certains grands-brûlés ayant un taux de mortalité plus élevé que les patients démontrant une activation de l'axe HPA proportionnelle au stress {Fuchs, Groger, et al. 2007}.

La déplétion des populations lymphoïdes observée dans divers modèle d'études de la brûlure est un effet causé par les GC. Plusieurs travaux de recherches ont appuyé ce fait. Premièrement, l'injection à des sujets normaux d'une dose d'hydrocortisone mimant les niveaux observés chez les grands-brûlés cause une lymphopénie similaire à celle retrouvée chez ces patients {Calvano, Albert, et al. 1987}. Deuxièmement, l'atrophie du thymus et de la rate montrée dans divers modèles de brûlure de rongeurs est causée par l'augmentation de la production de Cort en réponse au traumatisme {Nakanishi, Nishi, et al. 1998} ; {Fukuzuka, Edwards, et al. 2000} ; {D'Elia, Patenaude, et al. 2005}. De plus, l'apoptose importante des populations intra-épithéliales de lymphocytes T et B favorise la translocation bactérienne à travers la barrière gastro-instestinale. L'injection à ces souris de RU-486 (Mifepristone), un inhibiteur du GR, diminue le phénomène {Fukuzuka,

Edwards, et al. 2000}. Ceci a été confirmé dans un modèle où le traitement de rats brûlés avec cet inhibiteur augmente leur survie à la suite de l'infection de leurs plaies {Hawes, Richardson, et al. 1995}.

### **5.3 La réponse associée au stress oxydatif**

Les dommages causés par les brûlures sévères se manifestent tant au niveau local (lésions de la peau) que systémique (flambée oxydative, réponse neuro-inflammatoire, forte expression de molécules d'adhésion, production massive de cytokines et chimiokines). Les conséquences au niveau systémique sont telles qu'elles peuvent entraîner le MODS {Scener, Sehirli, et al. 2002}. Suite à la brûlure, plusieurs organes (foie, poumons, tractus gatro-intestinal, reins) sont touchés par une ischémie et des complications surviennent durant la phase de reperfusion. Cette diminution momentanée de l'apport sanguin artériel aux organes entraîne une baisse de l'oxygénéation des tissus, le catabolisme des purines, la production d'acide urique, favorise la formation de radicaux libres et la peroxydation des lipides. Plusieurs études portant sur la brûlure sévère et menées sur des modèles animaux ont démontré un lien entre les dommages tissulaires et les radicaux libres (ROS et NOS) {Saez, Ward, et al. 1984}; {Till, Hatherill, et al. 1985}. Ces radicaux libres majoritairement produits entre la 4<sup>e</sup> et la 6<sup>e</sup> heure post-brûlure augmentent l'œdème et la nécrose à la périphérie du site lésé.

#### **5.3.1 Thérapie anti-oxydante post-lésion thermique**

Le stress oxydatif est une des principales conséquences de la brûlure sévère et de nombreuses études ont démontré un lien entre les médiateurs pro-inflammatoires tels les ROS et les NOS et la pathophysiologie des grands-brûlés (voir section 1.3). Parallèlement, on observe chez ces patients une réduction globale des défenses naturelles enzymatiques permettant à l'organisme de neutraliser les ROS et les NOS tels : la SOD, la catalase et le système glutathion réductase/glutathion peroxydase {Saitoh, Ookawara, et al. 2001}; {LaLonde, Nayak, et al. 1997}; {Ding, Zhou, et al. 2002}. Divers travaux suggérant l'efficacité d'une thérapie anti-oxydante (vitamine A, C, E, GSH, mélatonine,

*ginkgo biloba*, *N*-acétyl-L-cystéine (NAC)) ont été publiés et leurs bienfaits sur : la normalisation des niveaux de ROS et NOS, la gestion de l'énergie, la protection de la circulation microvasculaire, la réduction de la peroxydation des lipides, la restauration des fonctions immunitaires et ultimement la diminution des cas de septicémie et de mortalité chez les grands-brûlés, ont tous été vérifiés {Horton 2003}; {Biesalski & McGregor 2007}; {Parihar, Parihar, et al. 2008}.

L'application topique de composés anti-oxydants telles les vitamines C et E aux grands brûlés a débuté dans les années 1950 et visait essentiellement à traiter les plaies {Klasson 1951}. Plus tard, diverses études démontrent un lien de cause à effet entre la chute des concentrations plasmatique en vitamine A, C, E, lycopène et β-carotène, la peroxydation des lipides et l'incidence du MODS ou de choc septique chez les grands-brûlés {Goode, Cowley, et al. 1995}; {Bertin-Maghit, Goudable, et al. 2000}. La vitamine E est une molécule liposoluble aux propriétés anti-oxydantes reconnues. La supplémentation du bolus alimentaire en vitamine C (0.5 – 14.2 mg/kg/jour), vitamine E (1200 UI/jour) ou β-carotène (90 mg/jour) a démontré son efficacité dans l'amélioration de l'état des grands-brûlés {Rock, Dechert, et al. 1997}. Horton et collègues (2001) ont étudié l'effet cardioprotecteur de l'administration conjointe des vitamines A, C et E à des rats ayant subit une brûlure sévère. Ils ont démontré que l'amélioration de la fonction cardiaque est reliée à l'inhibition du transfert nucléaire de NF-κB et à la diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1β et IL-6) par les cardiomyocytes {Horton, White, et al. 2001}.

La pathogenèse de la brûlure sévère implique la production de radicaux superoxyde ( $O_2^-$ ) et parallèlement la chute de l'activité enzymatique de la SOD et de la catalase {Saez, Ward, et al. 1984}. Plusieurs travaux de recherches ont démontré l'importance de ces deux enzymes dans l'atténuation de la réponse inflammatoire et la peroxydation des lipides. L'équipe de Saitoh et collègues (1994) a publié une étude dans laquelle l'injection de SOD à des rats ayant subi une brûlure sévère augmente leur taux de survie et diminue la peroxydation des lipides dans le plasma, les poumons et les reins {Saitoh, Okada, et al. 1994}. Dans une étude clinique impliquant des grands-brûlés, l'administration de SOD

conjuguée au poly-éthylène glycol (PEG-SOD; 1000 unités/kg) a prouvé son efficacité dans la réduction de la peroxydation des lipides {Thomson, Till, et al. 1990}. Cetinkale et collègues (1999) ont observé le rétablissement de la fonction immunitaire dans un modèle de réaction de l'hôte versus le greffon (HVGR) chez des rats brûlés soumis à une thérapie anti-oxydante au PEG-catalase (1200 UI/kg/jour) {Cetinkale, Sencl, et al. 1999}.

La présence d'un groupement thiol et son rôle de précurseur dans la synthèse du GSH confère au NAC des propriétés anti-oxydantes d'intérêt dans le traitement des grands-brûlés. Initialement utilisé avec succès pour favoriser la séparation du tissu brûlé des couches saines sous-jacentes de la peau {Levenson, Gruber, et al. 1981}, le NAC a démontré son efficacité pour prévenir les dommages tissulaires reliés au phénomène d'ischémie et de reperfusion en contrant les ROS {Cuzzocrea, Mazzon, et al. 2000}. De plus, le traitement de rats soumis à une brûlure sévère avec du NAC injectée par voie intrapéritonéale a réduit la peroxydation des lipides et préservé le GSH dans les poumons {Konukoglu, Cetinkale, et al. 1997}. Les propriétés anti-inflammatoires du NAC ont été documentés dans diverses études et se traduisent par la suppression de la production de cytokines pro-inflammatoires, l'inhibition de l'expression de molécules d'adhésion, et une baisse du transfert au noyau de NF-κB {Verhasselt, Vanden Berghe, et al. 1999}. Dans un modèle de brûlure sévère, l'administration de NAC à des rats a eu un effet cytoprotecteur sur l'intégrité de la barrière mucosale et a assuré une protection contre la translocation bactérienne {Ocal, Avlan, et al. 2004}.

Récemment, diverses molécules aux propriétés anti-oxydantes ont fait l'objet d'études sur des modèles animaux de brûlure sévère. Parmi celles-ci, la mélatonine a révélé des bienfaits non négligeables dans la prévention des dommages reliés au stress oxydatif post-brûlure. Cette hormone synthétisée par la glande pinéale (épiphysé) joue un rôle essentiel dans les rythmes biologiques {Maldonado, Murillo-Cabezas, et al. 2007}. Deux études réalisées par Sener et collègues, ont montré que la mélatonine (10mg/kg) injectée à trois reprises sur une période de 24 heures, préserve les niveaux de GSH et diminue le taux de malondialdéhyde, l'oxydation des protéines et l'activité de la myéloperoxydase dans les reins, le foie, les poumons et les intestins des rats brûlés {Sener, Sehirli, et al. 2002};

{Sener, Sehirli, et al. 2002}. Ce même groupe de recherche a aussi démontré l'effet protecteur des fonctions des poumons, des intestins et du foie suite à l'administration par voie intra-péritonéale d'un extrait d'ail à des rats ayant subit une brûlure sévère {Sener, Satyroglu, et al. 2003}. Aussi, une récente étude a montré les capacités anti-oxydantes d'un extrait de Ginkgo Biloba sur un modèle de rat soumis à une brûlure sévère. L'injection d'un extrait de Ginkgo biloba à des rats brûlés a préservé les niveaux de GSH et diminué le taux de malondialdéhyde, l'activité myéloperoxydase et les niveaux d'ALT, AST, LDH, collagène et TNF- $\alpha$  dans le sérum {Sakarcan, Sehirli, et al. 2005}. Aussi, l'acide caféïque phényle ester (CAPE) isolé à partir de la cire d'abeille, possède de fortes propriétés anti-oxydantes et immunostimulantes. Dans un modèle expérimental de brûlure sévère impliquant des rats, leur traitement avec du CAPE sur une période de 14 jours, a permis de diminuer dans le plasma l'activité xanthine oxydase, les taux de malondialdéhyde et de NO tout en préservant l'activité de la SOD {Hosnute, Gurel, et al. 2004}. De plus, une étude similaire a observé l'effet préventif du CAPE sur la peroxydation des lipides des érythrocytes {Armutcu, Gurel, et al. 2004}. Les conséquences physiologiques des diverses thérapies anti-oxydantes administrées aux grands-brûlés sont regroupées dans le **Tableau 5** qui suit.

Thérapie anti-oxydante	Conséquences physiologiques
Vitamines A, C, E	↓ MODS, restauration des fonctions endothéliales, ↓ cytokines pro-inflammatoires, restauration fonction cardiaque
Mélatonine	↑ glutathion, ↓ peroxydation des lipides et malondialdéhyde au niveau des reins, foie, poumons et intestins
N-acétyl-cystéine /glutathion	↑ glutathion rate et ganglions mésentériques, préservation de l'intégrité membrane gastro-intestinale, ↓ translocation bactérienne. ↓ peroxydation des lipides et niveaux de malondialdéhyde
CAPE	↑ survie ↓ activité XO, ↓ peroxydation de lipides, ↓ NO et malondialdéhyde dans le plasma
SOD/Catalase	↑ survie, ↓ peroxydation des lipides

**Tableau 5 :** Conséquences physiologiques des thérapies anti-oxydantes administrées aux grands-brûlés.

Malgré les récents succès des thérapies anti-oxydantes sur divers modèles animaux de brûlure sévère, il n'existe aucun consensus définitif au sein de la communauté scientifique sur l'utilisation de tels composés dans les unités de soins pour grands-brûlés. Des essais cliniques en cours devraient permettre d'identifier les molécules anti-oxydantes les plus susceptibles de faire partie d'un protocole de soins administrés aux patients gravement brûlés {Parihar, Parihar, et al. 2008}.

#### **5.4 Impacts de la brûlure sévère sur les lymphocytes T**

Le déficit immunologique observé chez les grands-brûlés a été longuement attribué à une réduction du nombre, mais aussi de l'activité des lymphocytes T, à l'augmentation de la réponse inhibitrice des cellules CD8<sup>+</sup>, à la présence dans le sérum de facteurs suppresseurs ainsi qu'à une modulation de la synthèse de certaines cytokines et de l'expression de leurs récepteurs spécifiques (Wolfe et al. 1982). Diverses études ont démontré une altération des populations lymphocytaires suite à une brûlure sévère. En effet, des niveaux réduits de lymphocytes totaux circulants de même que ceux résidants au niveau du thymus, de la rate, des ganglions furent mesurés et ce, pour une période de 48 à 60 jours post-brûlure. Ces changements affectent autant les sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> que CD8<sup>+</sup> {Barlow 1994}. Le **Tableau 6** qui suit décrit les principales dysfonctions affectant les lymphocytes T lors de la brûlure sévère.

#### Dysfonctions des lymphocytes T prédisposant à l'immunosuppression post-brûlure

- Perturbations de l'activité
- Réduction du ratio de cellules CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>
- Dérivation de la réponse de type Th1 vers le type Th2
- Anergie
- Apoptose

**Tableau 6 :** Principales dysfonctions des lymphocytes T lors de la brûlure sévère, tiré de Schaffer & Barbul (1998).

La brûlure sévère entraîne une lymphopénie. L'immunosuppression résultant de brûlures sévères a été associée à une importante réduction du nombre de lymphocytes circulants et à leur apoptose *in vitro* suite à leur stimulation avec divers agents mitogéniques {Teodorczyk-Injeyan, Cembrzynska-Nowak, et al. 1995}. Un des facteurs responsables de ce phénomène sont les GC libérés en réponse au stress de la brûlure sévère qui entraînent une atrophie de la rate et du thymus au jour 1 post-trauma {Fukuzuka, Edwards, et al. 2000}; {Teodorczyk-Injeyan, Cembrzynska-Nowak, et al. 1995}. Indépendamment, une augmentation de l'expression du ligand pour Fas (FasL) a été observé dans la rate, le thymus, les plaques de Peyer et corrèle avec l'apoptose massive des lymphocytes T présents dans ces tissus {Fukuzuka, Edwards, et al. 2000}. L'augmentation de l'expression du TNF- $\alpha$  dans le thymus et les plaques de Peyer a aussi été associée à l'apoptose des lymphocytes T {Cho, Adamson, et al. 2001}; {Woodside, Spies, et al. 2003}. Un autre élément responsable de l'apoptose massive des lymphocytes lors de la brûlure sévère est le NO. Ce facteur libéré entre autre, par les macrophages diminue la prolifération des cellules T, de même que la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  {Masson, Mathieu, et al. 1998}. Le NO arrête la division cellulaire des lymphocytes T activés en phase G1 et favorise leur apoptose via un mécanisme impliquant la P53 {Valenti, Mathieu, et al. 2005}. Peu importe le tissu et le mécanisme impliqué, l'apoptose post-brûlure a été notée principalement chez les cellules T CD4 $^{+}$  activées {Fazal & Al-Ghoul 2007}; {Patenaude, D'Elia, et al. 2005}.

La perturbation des lymphocytes T visible au jour 7-10 post-brûlure est une conséquence de l'activation systémique de ces cellules en réponse au traumatisme {Teodorczyk-Injeyan, Sparkes, et al. 1991}. Kavanagh et collaborateurs (1998) ont démontré, en utilisant un modèle de souris transgéniques dont le récepteur des cellules T (TcR) est réactif pour un Ag précis (ovalbumine), que la brûlure favorise l'activation massive de lymphocytes T naïfs CD4 $^{+}$ . De plus, ils ont noté une diminution de la prolifération des cellules T et de la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  chez les souris immunisées avec l'ovalbumine {Kavanagh, Kelly, et al. 1998}. L'anergie des lymphocytes T est caractérisée par leur incapacité à entrer en prolifération et à produire des cytokines en réponse à une stimulation antigénique. Ceci est causé à la fois par l'augmentation de

l'expression de protéines traduisant des signaux inhibiteurs telles SHP-1, c-Cbl et par la liaison de récepteurs co-répresseurs : PD-1, CD47 et CTLA-4 exprimés à la surface des lymphocytes T {Bandyopadhyay, De, et al. 2007}. L'incidence de mortalité des patients traumatisés est augmenté chez ceux dont l'anergie des cellules T a été identifiée {Pellegrini, De, et al. 2000}.

En accord avec l'anergie des lymphocytes T, une diminution de l'expression de l'antigène TAC/CD25 faisant partie du récepteur à l'IL-2 (IL-2R) et de la production d'IL-2 a été observée chez les grands-brûlés. Parallèlement, une meilleure survie des patients présentant un plus haut niveau de l'antigène TAC a été remarquée {Teodorczyk-Injeyan, Sparkes, et al. 1986}. Dans une autre étude, la baisse de production de l'IL-2 a été expliquée par l'inhibition de l'expression du facteur de transcription *c-fos* et l'ajout d'IL-2 exogène qui permet le rétablissement de la prolifération des splénocytes {Horgan, Mendez, et al. 1994}. Une autre étude a démontré que le sérum de patients brûlés contient des facteurs, alors non-identifiés, qui mènent à une réduction de la prolifération et de l'expression de IL-2R à la surface des cellules T {Ferrara, Peterson, et al. 1989}. Parmi ces facteurs notons le récepteur soluble à l'IL-2 (sIL-2R) qui diminue la biodisponibilité de cette cytokine pour les lymphocytes T. Ainsi, une forte concentration en sIL-2R a été mesurée dans le sérum de patients brûlés et corrèle avec une diminution de la prolifération des cellules T {Teodorczyk-Injeyan, Sparkes, et al. 1991}; {Jobin, Garrel, et al. 2000}.

De plus, l'hyper-activité des macrophages mène à la production de métabolites dérivés de l'acide arachidonique (i.e. prostaglandines, leukotriènes, thromboxanes) reconnus pour être de puissants immunomodulateurs. L'activité des cellules T est influencée négativement par ces médiateurs libérés lors de la brûlure {Alexander 1990}. Le métabolisme des PGE2 dépend de l'activité de synthèse de l'enzyme cyclooxygénase-2 (Cox-2) et de dégradation de l'enzyme prostaglandine 15-OH déshydrogénase (PGDH). Une augmentation des niveaux de PGE2 dans le sang est le résultat d'une plus forte expression de l'enzyme Cox-2 et d'une diminution de PGDH au niveau des poumons de souris brûlées {Hahn, Tai, et al. 1999}. L'inhibition de la synthèse de PGE<sub>2</sub> sur une

culture cellulaire de PBMC isolés de patients brûlés restaure la prolifération cellulaire et la production d'IL-2 {Grbic, Mannick, et al. 1991}. Le fait d'enlever les macrophages et de réduire les niveaux de PGE<sub>2</sub> d'une culture de splénocytes provenant de souris brûlées améliore la prolifération des lymphocytes T {Yang & Hsu 1992}. La suppression des fonctions des lymphocytes T par les PGE<sub>2</sub> est expliquée par une interférence avec le signal d'activation cellulaire délivré via le TcR et implique la PKC {Schwacha, Ayala, et al. 1999}. Une diminution de la mobilisation du Ca<sup>2+</sup> et de la phosphorylation de la protéine p59Fyn, une baisse de l'activité transcriptionnelle des facteurs NF-AT et AP-1 et de la production d'IL-2 sont observés. L'inhibition de la synthèse de PGE<sub>2</sub> *in vivo*, dans un modèle de brûlure de rat, restaure la liaison des facteurs de transcription au promoteur de l'IL-2 et la production de la cytokine chez les lymphocytes T {Choudhry, Mao, et al. 2002}. L'hyperactivité des macrophages au jour 7 post-brûlure et conséquemment la production de PGE<sub>2</sub>, est expliquée par l'activation de la p38 MAPK dans ces cellules {Alexander, Daniel, et al. 2004}.

Les voies de signalisation des MAPKs jouent un rôle important dans l'activation des lymphocytes T et la production de cytokines. Des études portant sur la brûlure sévère ont montré un défaut dans la signalisation des MAPKs. Une diminution de la phosphorylation de ERK 1/2 a été notée, *in vitro*, lors de la stimulation chez les lymphocytes T isolés de ganglions mésentériques de souris au jour 2 post-brûlure et corrèle avec une baisse de la prolifération de ces cellules {Choudhry, Ren, et al. 2004}. Une seconde étude menée au jour 3 post-brûlure a démontré une diminution de la phosphorylation des protéines ERK 1/2 et p38 causée par un défaut dans la mobilisation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire suite à la stimulation *in vitro* de lymphocytes T isolés des ganglions mésentériques et des plaques de Peyer {Fazal, Choudhry, et al. 2005}. Le Cort est un facteur qui modifie l'activité des MAPKs. L'élévation du Cort au jour 1 et 2 post-brûlure diminue la phosphorylation des protéines ERK 1/2 et p38 chez les lymphocytes T. La normalisation des niveaux de Cort dans ces souris a une influence positive sur l'activité de ERK 1/2 et p38 et restaure la production d'IL-2 et la prolifération cellulaire {Li, Rana, et al. 2005}. Les mêmes auteurs ont démontré au jour 1 post-brûlure, une augmentation de l'expression de la protéine phosphatase 1 (PP1) chez les cellules T isolées de ganglions mésentériques. L'inhibition

de l'activité de cette protéine favorise la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  et rétablit la prolifération cellulaire {Li, Schwacha, et al. 2006}.

L'activation des cellules T auxiliaires naïves *T Helpers* (Th0) à la suite de la présentation antigénique par les CPA provoque, sous l'influence des cytokines présentes dans l'environnement, leur conversion en cellules de type Th1 ou Th2 (voir section : **Différenciation des cellules T naïves en types Th1 vs Th2**). La brûlure favorise l'établissement du phénotype Th2 et la réponse adaptative au-delà du jour 7 est caractérisée par la production de cytokines de ce type et une susceptibilité accrue aux infections. Aussi, une augmentation de la production d'IL-4 par les cellules CD8 $^{+}$  est notée à partir du jour 5 post-brûlure {Zedler, Bone, et al. 1999}. Parallèlement, une diminution de la production d'IL-2 et de cytokines de type Th1 telles l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  par les splénoцитes de souris brûlées est observée au jour 10 post-trauma {O'Sullivan, Lederer, et al. 1995}.

Le développement de la réponse Th2 lors de la brûlure sévère est expliquée par l'activité des macrophages de souris brûlées qui ne parviennent plus à produire suffisamment d'IL-12 pour induire un phénotype Th1, même lorsque stimulés avec du LPS {Utsunomiya, Kobayashi, et al. 2001}. Parallèlement, le NO libéré par ces macrophages favorise la production d'IL-4 et d'IL10 par les cellules T et la génération du type Th2 {Daniel, Alexander, et al. 2006}.

La réponse T régulatrice exerce aussi une influence sur le type de réponse Th1 vs Th2. Dans un modèle de souris, une augmentation du nombre et de l'activité des cellules T régulatrices CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$  a été observée au jour 7 post-brûlure dans les ganglions drainant la blessure et la présence de ces cellules mène à la dépression de l'immunité de type Th1 {Ni Choileain, MacConmara, et al. 2006}.

## **Chapitre 2 : Objectifs du projet de recherche**

---

Le but de ce projet de recherche était de démontrer que la brûlure sévère s'accompagne d'une phase de sensibilité aux GC qui survient dans les premiers jours post-trauma et d'une période de résistance aux hormones de stress qui survient vers le 10<sup>e</sup> jour post-brûlure. De plus, nous voulions vérifier si cette phase de résistance au GC était influencée par l'état d'activation des lymphocytes T et leurs besoins en molécules anti-oxydantes.

### **Importance de la production locale de glucocorticoïdes lors de la brûlure sévère**

De précédents travaux de recherche menés dans divers laboratoires, dont le nôtre, avaient démontré un effet de la brûlure caractérisé par l'apoptose massive des thymocytes et une atrophie du thymus. Les travaux de Fukuzuka et collaborateurs (2000) ont ciblé les GC libérés massivement en réponse au stress de la brûlure, comme étant responsable de l'apoptose des thymocytes. Jusqu'à récemment, l'activité de l'axe HPA constituait la principale voie de régulation des GC et les glandes surrénales leur lieu de synthèse. Toutefois, l'expression de l'enzyme 11 $\beta$ -HSD1 au niveau des tissus cibles permet d'augmenter la biodisponibilité des GC. Le thymus est un organe où l'enzyme 11 $\beta$ -HSD1 est exprimée. Certaines études avaient limité la présence de l'enzyme au niveau des cellules épithéliales du thymus. Récemment, les travaux de Zhang et collaborateurs (2005) ont permis d'identifier cette enzyme au niveau des thymocytes, des lymphocytes T, des lymphocytes B, des cellules dendritiques et des macrophages, confirmant le rôle des GC dans le contrôle des réponses immunitaires. La sélection des thymocytes dans le thymus est un processus qui fait intervenir la signalisation conjointe du TcR et des GC. L'intensité du signal reçu de part et d'autre permet une sélection adéquate des cellules, la progression de leur maturation et l'instauration d'un répertoire de cellules T fonctionnelles. Diverses études portant sur la modification de l'expression du GR dans le thymus ont révélé des changements au niveau du processus de sélection des thymocytes et de la cellularité de l'organe. Ceci étant dit, aucune étude n'a encore vérifié le rôle de l'enzyme 11 $\beta$ -HSD1 dans le thymus. De plus, aucune situation *in vivo* dans laquelle l'expression de l'enzyme serait modifiée au sein de l'organe ou des thymocytes n'a encore été identifiée.

Ainsi, les objectifs spécifiques suivants ont été fixés :

- 1- Évaluer au jour 1 post-brûlure si ce traumatisme modifie l'expression de l'enzyme 11 $\beta$ -HSD1 au niveau du thymus total, cellules épithéliales et thymocytes.
- 2- Évaluer si l'expression de l'enzyme 11 $\beta$ -HSD1 au niveau des thymocytes augmente leur sensibilité aux GC.
- 3- Évaluer si les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et IL-6) augmentent l'apoptose induite par les GC via une action sur la 11 $\beta$ -HSD1.

#### **Évaluation des besoins en anti-oxydants chez les lymphocytes T spléniques**

La brûlure sévère cause un stress oxydatif important caractérisé par l'augmentation des radicaux libres et la peroxydation des lipides dans la circulation sanguine et s'accompagne d'une diminution de la synthèse de GSH. Le GSH est un tri-peptide formé de cystéine, glycine et glutamate et assure l'équilibre redox dans l'organisme en neutralisant les radicaux libres. Il a été montré qu'une thérapie anti-oxydante (*N*-acétyl cystéine) administrée à des souris brûlées régularisait les fonctions des lymphocytes T dans la rate au jour 7 post-brûlure. De plus, il semble que le rétablissement des niveaux de GSH dans la rate soit responsable de la normalisation des fonctions de ces cellules. Le système de transport Cystine/Glutamate, désigné  $x_c^-$ , permet l'importation de cystine par les cellules. Ce transporteur contribue au maintien des niveaux de GSH intracellulaire. Le système  $x_c^-$  est formé de deux protéines, xCT et la chaîne lourde de l'antigène 4F2 (4F2hc) aussi appelé CD98. L'activité du système est favorisée par divers stimuli tels : le diéthyl maléate (agent électrophilique), le peroxyde d'hydrogène, la déprivation en acides aminés, le TNF- $\alpha$  et le LPS. Plusieurs de ces facteurs sont des conséquences de la brûlure sévère et dans ces conditions, il ne serait pas surprenant d'observer une augmentation de l'expression et de l'activité du système  $x_c^-$ . Récemment, une étude de Taguchi et collègues a démontré que l'injection de LPS à des souris augmente l'expression de xCT dans le thymus et la rate ce qui suggère une adaptation des cellules au stress oxydatif.

Jusqu'à ce jour, aucune étude n'a encore vérifié la présence de xCT dans les lymphocytes T et on s'accorde pour dire que ces cellules ne possèdent pas de système  $x_c$ -actif. La cystéine est un acide aminé essentiel pour les lymphocytes T car ces cellules sont dépourvues d'un mécanisme de synthèse. *In vivo*, ce sont les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) qui procurent la cystéine aux lymphocytes T. *In vitro*, l'addition de 2-mercaptopropanoïde au milieu de culture permet l'entrée de cystéine dans les lymphocytes T isolés et assure leur prolifération. Par ailleurs, l'expression du système  $x_c$ - chez les lymphocytes T de souris brûlées serait une adaptation qui favoriserait l'activité de ces cellules.

Ainsi, les objectifs spécifiques suivants ont été fixés :

- 1- Évaluer la prolifération *in vitro* des lymphocytes T isolés provenant de souris brûlées et témoins en comparant leurs besoins en molécules anti-oxydantes.
- 2- Évaluer si la brûlure sévère favorise l'expression des protéines xCT et CD98 et augmente l'activité du système  $x_c$ - responsable de l'importation de cystine par les lymphocytes T.
- 3- Évaluer si l'inhibition de l'activité du système  $x_c$ - normalise la prolifération des lymphocytes T provenant de souris brûlées.

### **Évaluation de la sensibilité aux GC des lymphocytes T spléniques**

Les lymphocytes T sont sensibles à l'action de GC. Aux doses physiologiques, les hormones de stress exercent une activité permissive en augmentant l'expression du CD4, de la chaîne alpha du récepteur à IL-2 et la prolifération des cellules stimulées. Toutefois, aux doses supra-physiologiques, comme celles observées lors de la brûlure sévère, les hormones de stress influencent négativement les fonctions des lymphocytes en diminuant leur prolifération, la synthèse d'IL-2, d'IFN- $\gamma$  et en induisant l'apoptose des cellules naïves. Des travaux menés dans notre laboratoire ont démonté une activation des lymphocytes T spléniques au jour 10 post-brûlure. Or, l'activation des lymphocytes T est reliée à une perte de sensibilité de ces cellules aux GC. Les mécanismes qui expliquent cette résistance sont variés et diffèrent d'une situation à une autre. Ainsi, l'interaction

directe du GR avec les facteurs de transcription NF-κB, STATs et AP-1, la phosphorylation du GR par le p38 MAPK, une baisse du recrutement de HDAC-2 par le GR causent tous une diminution de la sensibilité des cellules aux GC. Aussi, plusieurs pathologies inflammatoires telles l'asthme, la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) et l'arthrite rhumatoïde favorisent une résistance aux GC. La brûlure sévère est une situation unique qui se traduit par une forte activation des lymphocytes T dans un contexte pro-inflammatoire.

Ainsi, les objectifs spécifiques suivants ont été fixés :

- 1- Évaluer le niveau de sensibilité aux GC des lymphocytes T provenant de la rate de souris brûlées au jour10 post-brûlure en mesurant divers paramètres influencés par les hormones de stress : prolifération, apoptose, production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ .
- 2- Démontrer que l'activité intrinsèque des lymphocytes T est responsable de cette résistance via l'expression de la forme phosphorylée de la protéine p38 MAPK.
- 3- Évaluer si l'inhibition pharmacologique de l'activité de la p38 MAPK nivelle les différences observées entre lymphocytes T provenant de souris témoins et brûlées

## **Chapitre 3 : Article I**

---

## Mise en contexte

---

Le thymus est particulièrement sensible aux hormones de stress et la brûlure sévère induit une atrophie de cet organe visible dès le jour 1 post-trauma {Taylor, Smart, et al. 1989}; {Tarcic, Ovadia, et al. 1998}; {Dominguez-Gerpe & Rey-Mendez 1997}. Cette réduction de la taille du thymus est causée principalement par l'apoptose massive des cellules DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, dites cortico-sensibles {Nakanishi, Nishi, et al. 1998}. De précédentes études ont permis de relier cette mortalité à une élévation des niveaux de Cort dans le sang {Fukuzuka, Edwards, et al. 2000}; {D'Elia, Patenaude, et al. 2005}. La plupart des études publiées à ce jour s'entendent sur un concept général : l'activation de l'axe HPA lors d'un stress conduit à une sécrétion de cortisol par les glandes surrénales, ce qui augmente la concentration de l'hormone disponible sans discrimination pour tous les tissus de l'organisme {Swartz & Dluhy 1978}. Pour l'instant, seul le clivage du transporteur spécifique de l'hormone, la CBG par des protéases libérées aux sites inflammatoires permettrait d'augmenter la concentration locale de l'hormone au niveau des tissus cibles {Pemberton, Stein, et al. 1988}; {Hammond, Smith, et al. 1990}. Ainsi lors de la réaction inflammatoire, la quantité de cortisol biologiquement actif dans la circulation sanguine est influencée non seulement par la production de l'hormone mais aussi par les niveaux et l'intégrité de la CBG {Pugeat, Bonneton, et al. 1989}; {Beishuizen, Thijs, et al. 2001} .

Récemment, la découverte d'une enzyme responsable de l'inter-conversion des formes actives et inactives du cortisol expliquerait un contrôle supplémentaire des niveaux de l'hormone biologiquement active aux sein des tissus cibles. L'enzyme 11 $\beta$ -HSD1 est responsable de la conversion locale de cortisone inactive en cortisol actif {Seckl & Walker 2001}. Or, l'expression de la 11 $\beta$ -HSD1 dans le thymus et la rate suggèrent une production locale de GC au sein même des organes primaires de la réponse immunitaire {Thompson, Han, et al. 2004}; {Moore, Hoong, et al. 2000}. Il a d'ailleurs été démontré que les cellules épithéliales du thymus exprimaient toutes les enzymes responsables de la conversion du cholestérol en cortisol {Pazirandeh, Xue, et al. 1999}, ce qui suggère un lien étroit entre la production des GC et leur rôle dans la maturation des thymocytes

{Lechner, Dietrich, et al. 2001}. Dernièrement, la découverte de l'expression de l'enzyme chez les lymphocytes T périphériques {Zhang, Ding, et al. 2005}, les cellules dendritiques {Freeman, Hewison, et al. 2005}, les macrophages {Ishii, Masuzaki, et al. 2007}, les lymphocytes B {Zhang, Ding, et al. 2005} et les thymocytes {Nuotio-Antar, Hasty, et al. 2006} suggère qu'elle influence la concentration intracellulaire en Cort et l'induction de gènes sous le contrôle des GC. Aussi, il a été démontré que l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ , des cytokines pro-inflammatoires, augmentaient l'expression et/ou l'activité de la 11 $\beta$ -HSD1 {Chisaka, Johnstone, et al. 2005}; {Yong, Harlow, et al. 2002}; {Evagelatou, Peterson, et al. 1997}. Or, ce sont ces mêmes cytokines qui sont produites massivement dans les premières heures suivant le traumatisme de la brûlure sévère {Drost, Burleson, et al. 1993}.

À ce jour, aucune étude n'a pu identifier une situation physiologique où l'expression de la 11 $\beta$ -HSD1 influencerait la maturation, l'activité ou la survie des thymocytes.

Plus spécifiquement, nous voulions examiner si:

- i) la brûlure causait un changement dans l'expression de l'enzyme 11 $\beta$ -HSD1 au niveau du thymus, des cellules épithéliales et/ou des thymocytes ;
- ii) la présence de la 11 $\beta$ -HSD1 au sein des thymocytes pouvait augmenter leur sensibilité aux GC ;
- iii) les cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) pouvaient influencer la sensibilité des thymocytes aux GC via l'activité de la 11 $\beta$ -HSD1.

---

**Résumé français**

---

**Regulation of glucocorticoids sensitivity in thymocytes from burn-injured mice.**

Michele D'Elia, Julie Patenaude et Jacques Bernier

Institut National de la Recherche Scientifique - Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7.

Les glucocorticoïdes (GC) sont des hormones stéroïdiennes importantes qui assurent un rôle vital pour l'organisme en contrôlant le développement, le métabolisme cellulaire, la glycémie et la réponse immunitaire. Leur production constante suit un rythme circadien et devient maximale lors de stress divers. Des études antérieures menées sur un modèle murin ont démontré que la brûlure sévère causait une atrophie du thymus qui serait reliée à une augmentation de la production de glucocorticoïdes. Même si les GC sont principalement synthétisés par les glandes surrénales, des faits récents démontrent que ces hormones sont produites à partir de tissus non-surrénaliens. D'ailleurs, le thymus exprime toutes les enzymes stéroïdogéniques nécessaires pour produire des GC actifs. L'enzyme  $11\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase type 1 ( $11\beta$ -HSD1) est responsable de l'activation locale des GC.

Dans cette étude nous démontrons chez des souris du jour 1 post-brûlure, une augmentation de l'apoptose de thymocytes lorsque exposés *in vitro* à des concentrations croissantes de corticostérone (CORT). Ceci fut expliqué par la hausse concomitante des niveaux du récepteur à GC (GR) et de l'expression de l'enzyme  $11\beta$ -HSD1 chez ces cellules. De plus, nous avons démontré que les thymocytes étaient en mesure de convertir

l'hormone inactive 11-dehydrocorticosterone (DHC) en CORT active et que l'utilisation de l'acide 18 $\beta$ -glycyrrhetinique (GA), un inhibiteur spécifique de l'enzyme 11 $\beta$ -HSD empêchait cette réaction. Nous avons confirmé l'expression de la 11 $\beta$ -HSD1 dans la lignée cellulaire dérivée d'un thymome 267S3 et l'activité de l'enzyme était responsable d'une plus grande sensibilité de ces cellules à l'apoptose induite par le CORT. Finalement, nous avons démontré que l'exposition *in vitro* de thymocytes aux cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6) augmentait la sensibilité des thymocytes à l'apoptose induite par la conversion de DHC en CORT démontrant, par le fait même, l'implication de la 11 $\beta$ -HSD1 dans ce mécanisme. En résumé, nous sommes en mesure d'affirmer que la brûlure sévère augmente chez les thymocytes l'expression de la 11 $\beta$ -HSD1 ce qui entraîne une augmentation de leur sensibilité à l'apoptose induite par le CORT. La présence de cette enzyme au sein même des thymocytes lui suggère un rôle dans la maturation intrathymique des lymphocytes T et l'établissement d'un répertoire immunitaire.

\* Article publié dans *American Journal of Physiology : Endocrinology and Metabolism*

**Contribution des auteurs**

---

Les manipulations des souris lors des journées d'application du choc thermique et de sacrifice de même que la préparation des organes et l'isolation des cellules ont été effectuées avec l'aide de ma collègue de laboratoire, Julie Patenaude. Par la suite, j'ai réalisé toutes les expériences décrites dans cet article. J'ai entièrement rédigé le manuscrit, avant de le remettre au Dr Bernier, qui l'a lu, corrigé et soumis au journal.

## Regulation of glucocorticoid sensitivity in thymocytes from burn-injured mice

*Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.*

Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009 Jan;296(1):E97-104.

doi: 10.1152/ajpendo.90582.2008. Epub 2008 Nov 11.

Regulation of glucocorticoid sensitivity in thymocytes from burn-injured mice.

D'Elia M, Patenaude J, Bernier J.

## **Chapitre 4 : Article II**

---

### Mise en contexte

---

La dysfonction des lymphocytes T est une des causes majeures de l'immunosuppression qui accable les grands-brûlés. Cette dysfonction est caractérisée par une diminution de la prolifération, de la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ , une augmentation de l'apoptose et un état d'anergicie {Teodorczyk-Injeyan, Sparkes, et al. 1991}; {Barlow 1994}. Plusieurs études se penchant sur cette problématique ont tenté d'identifier les causes responsables de ce mal fonctionnement. Parmi celles-ci, le stress oxydatif a été ciblé {Bertin-Maghit, Goudable, et al. 2000}. La stimulation antigénique des lymphocytes T provoque une série de changements intracellulaires menant à leur activation, mais augmente aussi la production de radicaux libres {Devadas, Zaritskaya, et al. 2002}. La prolifération des cellules T est le résultat d'une balance intracellulaire entre molécules pro et anti-oxydantes. Le glutathion (GSH) est la principale molécule anti-oxydante synthétisée par les lymphocytes T pour neutraliser les radicaux libres {Hadzic, Li, et al. 2005}. Le GSH est un tripeptide formé par l'association de glycine, de glutamate et de cystéine. Ce dernier joue un rôle limitant dans les réactions menant à sa synthèse. La brûlure sévère cause une augmentation du stress oxydatif et s'accompagne d'une diminution de la production de GSH dans la rate {Ocal, Avlan, et al. 2004} . Une relation existe entre la disponibilité du GSH et la prolifération des lymphocytes T. Il a été démontré qu'une thérapie anti-oxydante via l'administration de *N*-acétyl cystéine (NAC) permet de rétablir les niveaux de GSH et l'immunité adaptative dans la rate de souris brûlées {Cetinkale, Senel, et al. 1999}.

La cystéine n'est pas stable dans le milieu extracellulaire et existe conjuguée à elle-même sous la forme de cystine. L'entrée de cystine est permise chez les cellules qui expriment à la membrane le système de transport  $x_c^-$  {Sato, Tamba, et al. 1999}. Ce système est formé par l'association des protéines CD98 et xCT. La présence de CD98 et l'augmentation de son expression chez les lymphocytes T stimulés ont été documentées. Toutefois, ces cellules n'expriment pas xCT et ne peuvent importer la cystine {Gmunder, Eck, et al. 1991}. Qui plus est, les lymphocytes sont dépourvus de cystathionase, l'enzyme responsable de la production de cystéine à partir de méthionine, c'est ainsi que la cystéine

est un acide aminé essentiel pour les lymphocytes {Eagle, Washington, et al. 1966}. Dans les réactions immunes spécifiques, les lymphocytes T interagissent avec les cellules présentatrice d'antigènes (CPA). Il en résulte l'augmentation de la production de cystéine par les macrophages ou les cellules dendritiques {Angelini, Gardella, et al. 2002}. Or, c'est la cystéine libérée dans le micro-environnement réducteur de la jonction immunitaire, qui est récupérée par les lymphocytes T et permet leur prolifération {Edinger & Thompson 2002}. Contrairement aux lymphocytes, les CPA expriment xCT et possèdent donc un système  $x_c^-$  actif {Sato, Fujiwara, et al. 1995}. Aussi, son expression est favorisée par les radicaux libres, les LPS bactériens et la déprivation d'acides-aminés, toutes des conséquences de la brûlure sévère {Sato, Kuriyama-Matsumura, et al. 2001}; {Sato, Nomura, et al. 2004}. Collectivement, ces travaux suggèrent que la balance intracellulaire en cystéine contrôle l'activation et la prolifération des lymphocytes T.

Les travaux de recherche de notre laboratoire ont remarqué au jour 10 post-brûlure une forte activation des lymphocytes T spléniques et une plus grande proportion de cellules se dirigeant en apoptose {Patenaude, D'Elia, et al. 2005}. Cette étude a pour but de vérifier si l'activité des lymphocytes T spléniques au jour 10 post-brûlure est en relation directe avec leurs besoins en cystéine.

Plus spécifiquement, nous voulions examiner si :

- i) la brûlure sévère modifie les besoins extrinsèques en molécules anti-oxydantes chez les lymphocytes T spléniques;
- ii) l'expression de xCT et de CD98, composant le système  $x_c^-$ , est modifiée chez les lymphocytes T spléniques au jour 10 post-brûlure;
- iii) l'activité du système  $x_c^-$  contrôle l'activation et la prolifération des lymphocytes T.

---

**Résumé français**

---

**Thermal injury induces expression of cystine/glutamate transporter ( $x_c^-$ ) in mouse T cells**

Michele D'Elia, Julie Patenaude, Charles Dupras et Jacques Bernier

Institut National de la Recherche Scientifique - Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7.

Le système de transport  $x_c^-$  est formé des protéines CD98 et xCT qui s'associent pour permettre aux cellules l'importation de cystine et est faiblement exprimé à la surface des lymphocytes T. La brûlure sévère cause une augmentation du stress oxydatif, une carence en protéines et la diminution des niveaux de glutathion (GSH). Ces trois facteurs induisent l'expression de la protéine xCT et contrôlent l'activité du système  $x_c^-$  en favorisant l'importation de cystine. De nombreuses études portant sur la brûlure sévère ont décrit un malfonctionnement généralisé des lymphocytes T et l'utilisation d'une thérapie anti-oxydante prodiguée post-trauma dans un modèle murin a démontré la normalisation des niveaux de GSH et la restauration des fonctions immunitaires de cellules de la rate au jour 7 post-brûlure. Dans cette étude, nous avons voulu vérifier si la brûlure sévère induisait l'expression du système  $x_c^-$  au niveau des lymphocytes T de la rate. Pour démontrer ce fait, nous avons isolé les cellules T de rates de souris témoins et brûlées au jour 10 post-trauma et nous avons par la suite évalué leur prolifération *in vitro* dans un milieu de culture supplémenté ou non de 2-mercaptopéthanol (2-ME), une molécule anti-oxydante indispensable à la prolifération *in vitro* des lymphocytes T. L'importation de cystine a été caractérisée chez des cultures cellulaires de lymphocytes T

stimulés avec un anticorps anti-CD3. Une relation entre l'expression de xCT, l'activité du système  $x_c^-$  et la prolifération des lymphocytes T spléniques dans un environnement pauvre et riche en molécules anti-oxydantes a été vérifiée. Nos résultats démontrent que seulement les lymphocytes T de souris brûlées expriment xCT et prolifèrent dans un milieu de culture pauvre en cystéine (sans 2-ME). La viabilité cellulaire ainsi que l'expression du CD25 (chaîne alpha du récepteur à l'IL-2) étaient plus importantes chez les cellules T de souris brûlées lorsque comparées aux cellules de souris témoins. L'expression du système  $x_c^-$  a rendu possible l'importation  $^{14}\text{C}$ -cystine par les lymphocytes T de souris brûlées et l'inhibition spécifique du transporteur via l'exposition des cellules à la sulfasalazine (SASP) a diminué significativement la prolifération des lymphocytes T. En résumé, ces résultats démontrent que l'expression de xCT chez les lymphocytes T est une adaptation de ces cellules suite à une brûlure sévère. La présence d'un système  $x_c^-$  actif chez les cellules T de souris brûlées augmente leur niveau d'activation et diminue leur dépendance en molécules anti-oxydantes produites par les cellules présentatrices d'antigènes. Toutefois, cette situation conjuguée à l'hyperactivité des macrophages observée post-brûlure aurait pour effet d'augmenter la proportion de cellules T devenant anergiques suite à leur sur-stimulation.

\* Article soumis à Immunology letters

**Contributions des auteurs**

---

Les manipulations des souris lors des journées d'application du choc thermique et de sacrifice de même que la préparation des organes et l'isolation des cellules ont été effectuées avec l'aide de ma collègue de laboratoire, Julie Patenaude. Par la suite, j'ai réalisé toutes les expériences décrites dans cet article. Charles Dupras a effectué l'immunobuvardage Western qui est présenté dans la figure 4. J'ai entièrement rédigé le manuscrit, avant de le remettre au Dr Bernier, qui l'a lu, corrigé et soumis au journal.

**Burn injury induces the expression of  
cystine/glutamate transporter  $x_c^-$  in mouse T cells**

---

**Burn injury induces the expression of cystine/glutamate transporter ( $x_c^-$ ) in mouse T cells**

Michele D'Elia<sup>1</sup>, Julie Patenaude<sup>1</sup>, Charles Dupras<sup>1</sup> and Jacques Bernier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Recherche Scientifique - Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

**Contact information :** Jacques Bernier, PhD  
Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier,  
531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7  
Tel: (450) 687-5010 (ext.8813)  
FAX: (450) 686-5501  
e-mail: [jacques.bernier@iaf.inrs.ca](mailto:jacques.bernier@iaf.inrs.ca)

**Keywords :** T cells, spleen, inflammation, cell proliferation, mice, burn injury

### ***1. Summary***

System  $x_c^-$  transporter, formed by the association of CD98 and xCT proteins, regulates the import of cystine into cells and is poorly expressed in T lymphocytes. Thermal injury is associated with high oxidative stress, decreased levels of glutathione (GSH) and protein deficiency, all described as promoters of xCT expression and system  $x_c^-$  activity. T cell dysfunction is a consequence of thermal injury and has been related to oxidative stress. In order to evaluate if thermal injury induces system  $x_c^-$  expression in splenic T lymphocytes, cells were isolated from sham- and burn-injured mice at day-10 post-burn and cultured in 2-mercaptoethanol (2-ME)-rich and -free media. Isolated splenic T cells were stimulated and cell proliferation, system  $x_c^-$  expression and cystine transport activity were measured. Our results demonstrate that only burn-injured T cells express xCT and proliferate in (2-ME)-free media. In these cells, viability and CD25 expression was higher than control T cells.  $x_c^-$  system expression was responsible for significantly higher  $^{14}\text{C}$ -cystine uptake by burn-injured T cells and its inhibition by sulfasalazine (SASP) decreased significantly their proliferation. Overall, these results demonstrate that xCT expression is induced by thermal injury in T lymphocytes and that cystine import by  $x_c^-$  leads to T cell dysfunction.

## ***2. Introduction***

Antigenic stimulation of T lymphocytes induces a series of activation processes including tyrosine phosphorylation in various proteins, increase of  $\text{Ca}^{2+}$ , induction of various genes such as IL-2 and IL-2R  $\alpha$ -chain. T cell activation also stimulates reactive oxygen species (ROS) production [1,2]. It has been reported that mitogenically induced lymphocyte proliferation is affected or regulated by various thiol compounds [3]. Glutathione (GSH) is the major scavenger for ROS in T cells. A direct relationship exists between GSH availability and the proliferative response of T lymphocytes because when cells are cultured with the specific GSH inhibitor L-buthionine-S,R-sulfoximine (BSO), proliferation in response to mitogens is inhibited [4;5]. L-cysteine and GSH enhance the proliferation of rabbit peripheral lymphocytes stimulated by mitogens [6]. GSH is a tripeptide and cysteine can be rate limiting in GSH synthesis. The addition of cysteine to fresh resting lymphocytes only partially prevented the rapid decrease of GSH levels. However, in lipopolysaccharides (LPS)-activated splenocytes the addition of cysteine enhanced cellular GSH levels in a dose-dependant manner [7].

Previous studies in lymphocytes identified cysteine as a rate limiting step for cell growth and proliferation after antigen receptor activation [8]. An equilibrium exist between cysteine, in the reduced form, and cystine, in the oxidized form. Cystine is predominant in the extracellular environment, while cysteine levels are elevated in the reduced intracellular environment [9;10]. The entry of cystine into cells is regulated by the expression of system  $x_c^-$  transporter which exchanges one glutamate for one cystine molecule. System  $x_c^-$  is formed by two proteins, CD98 and xCT [11]. Even though CD98

is expressed in mature T cells and upregulated following activation, T lymphocytes express low levels of xCT and are not able to take up cystine from the surrounding environment and convert it to cysteine [12]. Furthermore, lymphocytes have been reported to lack cystathionase, an enzyme essential for the production of cysteine from methionine, and thus cysteine is essential for lymphocytes [13]. During a specific immune response, T cells interact with antigen-presenting cells (APC). It has been shown that this interaction increased both cystine uptake and cysteine production by macrophages or dendritic cells [14]. Unlike lymphocytes, APC express high levels of xCT which is the main regulator of the system  $x_c^-$  activity and its expression is induced by electrophilic agents like diethyl maleate [15], oxygen [16], hydrogen peroxide [17], bacterial LPS [18] and amino-acid deprivation [19]. Unless APC make cysteine available, antigen-stimulated T cells will be unable to increase protein synthesis, proliferate or secrete immunoregulatory cytokines [8,14,20].

It is well known that the addition of 10-50  $\mu\text{M}$  of 2-mercaptoethanol (2-ME) to cell media culture supports the growth of primary T lymphocytes cultures [21;22]. The action of 2-ME on mouse spleen lymphocytes was related to the membrane transport of cysteine [7;23]. *In vitro* culture of T cells with 2-ME produced profound effects such as preventing the loss of GSH, enhancing their proliferation, preventing their apoptosis and functionally replacing antigen-presenting cells [24;25-28].

Burn injuries are associated with oxidative stress, GSH depletion and immunosuppression. Macrophage hyperactivity has been related to T cell dysfunction

post-burn injury [29]. This condition leads to increased susceptibility to bacterial infections and sepsis which is associated with high lethality in post-burn patients. A recent study has demonstrated the induction of cystine/glutamate transporter in the spleen by LPS in a murine model of endotoxemia [30]. Only a few reports have shown a link between the intracellular cysteine equilibrium and the immune system following thermal injury. Antioxidant therapy has been introduced to early post-burn injury protocols to prevent oxidative stress damage [31]. *N*-acetyl cysteine given to burned rats has demonstrated a cytoprotective role in intestinal mucosal barrier and preventive effects against burn-induced bacterial translocation [32]. Furthermore, it was shown in a rat model of burn injury that antioxidant therapy given for 7 days following the trauma significantly improved cell-mediated immunity [33].

Sulfasalazine (SASP) is a drug commonly used in the treatment of inflammatory bowel disease, a T-cell mediated autoimmune disease. This drug has recently been found to specifically inhibit the  $x_c^-$  cystine transporter [34]. It is believed that SASP is effective in inflammatory bowel disease because it inhibits the growth and proliferation of autoreactive T cells that initiate the inflammatory response [35]. Collectively these data suggests that intracellular cysteine levels regulate T cell activity. We hypothesize that thermal injury affected T cell proliferation by modifying its dependency for low molecular weight thiols such as 2-ME or cysteine delivered by APC. Surprisingly, our results indicate that *in vitro* proliferation of burn-injured T cells is independent of 2-ME supplementation in cell culture media and that these cells express xCT. In addition, the  $x_c^-$  cystine/glutamate transporter was found to be active in burn-injured T cells and cystine import was inhibited by SASP. Moreover, SASP significantly reduced burn-injured T cell

proliferation. These results show for the first time the expression of system  $x_c$ - in lymphocytes and suggests that intracellular cysteine content is important in regulating burn-injured T cell response.

### **3. Materials and Methods**

#### *Animals*

All experiments were performed on 6-week-old male C57BL/6 mice (Charles River Laboratories, St-Constant, Quebec, Canada). The mice were acclimatized for a period of 2 weeks prior to the initiation of any procedures and were housed in a central animal facility under strictly controlled temperature, relative humidity and a 12-h light/dark cycle. They were kept in cages, each containing five mice. Standard chow (Richmond Standard Lab Diet; Lab Diet, Richmond, IN, USA) and water were provided *ad libitum*. The Institutional Animal Care Committee reviewed and approved all procedures performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines.

#### *Thermal injury*

On day 0 of the experiment, mice were anaesthetized with Isoflurane gas (CDMV, St-Hyacinthe, Quebec, Canada). Animals were randomly assigned to either a control group or burn group, each containing 8 animals. Animals were then anaesthetized with a single dose of pentobarbital delivered intra-peritoneally. Thermal injury was performed as described in previously published reports from our laboratory [36].

*Cell preparation*

On the day of the experiment, mice were sacrificed and spleen were removed and prepared immediately for study. The spleens were prepared individually as single-cell suspensions by digestion with Collagenase D (1mg/ml)/Dnase (20 $\mu$ g/ml) (Roche Diagnostics, Laval, Qc, Canada) solution in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Oakville, On, Canada). The suspensions were washed three times with HBSS and red blood cells were eliminated by osmotic shock. The cells were resuspended in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), and antibiotic solution (100 IU/ml penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin; Sigma-Aldrich). Cell viability was determined by trypan blue exclusion and was consistently greater than 90%. T cells were purified from mouse spleen cell suspensions using MACS separation column system with Pan T cell isolation kit (Miltenyi biotec, Auburn, CA, USA). The purity of the obtained isolated T cells was determined by flow cytometry using rat anti-mouse: CD3-FITC-conjugated antibody (Serotec, Raleigh, NC, USA) and was consistently around 98 %. B cell (CD19) contamination represented less than 2% of the cells while less than 1 % of the contaminating cells were macrophages (F4/80) or dendritic cells (CD11c).

*In vitro proliferation assay*

For lymphocytes proliferation studies, anti-CD3 (clone 17A2; eBioscience, San Diego, CA, USA) coated 96-well flat bottom tissue culture plates (Sarstedt, Montreal, Qc, Canada) were prepared by adding 100 $\mu$ l per well of the antibody (1 or 10  $\mu$ g) diluted in PBS and then incubating the plates overnight at 4°C. The plates were washed three times prior the addition of T lymphocytes. 1 x 10<sup>6</sup>/ml isolated T cells were cultured in a volume

of 200 µl/well in culture media supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS) with or without 50 µM 2-ME. When required, purified T cells were preincubated for 30 min at 37°C with 0.2 mM SASP (Sigma-Aldrich), an system  $x_c$ - inhibitor, or culture media (Sigma-Aldrich) and subsequently transferred to tissue culture plates. All cultures were performed in triplicate. Cells were cultured for 60 hours at 37°C, with 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator, all cultures were pulsed with 1 µCi/well of [<sup>3</sup>H]TdR (GE Healthcare Bio-Sciences; Baie-d'Urfee, Quebec, Canada). Cells were harvested 12 hours later onto glass fiber filter using a Skatron cell harvester (Skatron Instruments, Sterling, VA, USA). Radioactivity was determined with a liquid scintillation counter (LKB Wallac).

#### *Cell cycle analysis*

Propidium iodide staining followed by flow cytometry was used to evaluate cell cycle analysis. Briefly, 1x10<sup>6</sup> isolated T cells from sham and burn-injured mice were cultured in 24-well plates pre-coated with anti-CD3 (10 µg/ml) (eBioscience) in complete RPMI supplemented with 10% FCS (Sigma-Aldrich) and with or without 50 µM 2-ME. Following culture, cells were pipetted into 12x75mm centrifuge tube (Sarstedt) and washed twice with PBS. The pellet was then resuspended in 300 µl (50 µg/ml propidium iodine in 0.1% sodium citrate and 0.1% Triton X-100). 10 µg of RNase was added and the tubes were placed in the dark at 37°C for 1 hour. Cell cycle was evaluated by flow cytometry with FACScan® (BD Biosciences, Mississauga, On, Canada). T cell apoptosis was evaluated by quantifying DNA sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> events in cell cycle. Analysis was performed on 10 000 collected events using WinMdi software.

*Quantification of intracellular reactive oxygen species (ROS)*

ROS were detected by flow cytometry using H<sub>2</sub>-DCFDA probe according to the manufacturer's instructions (Molecular Probes Inc, OR, USA). Briefly, 1 x 10<sup>6</sup> T cells were washed twice with pre-warmed HBSS and resuspended in the same buffer containing 5µM dye. Cells were incubated 30 minutes. Following this incubation, cells were washed twice with pre-warmed HBSS, respuspended in HBSS and incubated for another 30 minutes. Cells were analyzed for fluorescence by flow cytometry with FACScan® (BD Biosciences). Analysis was performed as described above.

*Phenotyping analysis*

Isolated T cells were analyzed following *in vitro* culture. 0.5 x 10<sup>6</sup> cells were washed twice with HBSS. Non-specific binding sites were blocked with 10µg/ml human IgG (Sigma-Aldrich) and cells were stained with 1ug of rat anti-mouse:CD98 FITC-conjugated antibody (eBioscience) and anti-mouse:CD25 R-PE-conjugated (eBioscience). Cells were washed twice with ice-cold HBSS and analyzed by flow cytometry with FACScan® (BD Biosciences). Analysis was performed as described above.

*Western blot*

Cells were lysed in RIPA buffer and the protein concentration was determined by Bradford assay. 50µg of total protein from cells lysis were diluted in sample buffer, subjected to SDS-PAGE and electroblotted onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, Ca, USA). Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk diluted in Tris-buffered saline (TBS; 50 mM Tris , pH 8.0, and 150 mM NaCl) solution for one hour at room temperature and hybridized overnight at 4°C with anti-xCT (NB300-318; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) diluted 1:500 in blocking buffer. Specific antibody-

antigen complexes were identified using a horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit antibody (sc-2004; Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and ECL Western blotting detection reagents (GE Healthcare Biosciences). Membranes were stripped and reprobed with antibody against mouse actin (A4700; Sigma-Aldrich) to evaluate protein loading in each sample.

#### *<sup>14</sup>C-Cystine transport assay*

<sup>14</sup>C-Cystine transport was measured by the method previously described by Bannai and Kitamura [37] with minor modifications. Briefly, isolated T cells were washed once with PBS and twice with L-cystine-free RPMI 1640 medium and adjusted to  $1 \times 10^6$  cells in pre-warmed L-cystine-free media supplemented or not with 50 µM 2-ME. Cells were also cultured in 2-ME-free media and pre-treated for 30 minutes at 37°C with 0.2µM SASP.  $2 \times 10^6$  cells/well were placed in 24-well cell culture plates pre-coated with anti-CD3 (10 µg/ml) (eBioscience). <sup>14</sup>C-Cystine (Perkin Elmer life and analytical sciences, Woodridge, On, Canada) was added to each 0.5µCi/well and incubated at 37°C for 3 days. The transport was terminated by washing the cells with ice-cold PBS three times. Radioactivity was determined with a liquid scintillation counter (LKB Wallac).

#### *Statistical analysis*

All data are expressed as mean +/-SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA comparison test using the Graphpad InStat 3.05 software program (GraphPad Software, San Diego, Ca). Differences between groups were considered statistically significant when the probability by chance was less than 5 % ( $p < 0.05$ ). All experiments were performed in triplicates to confirm our results.

#### **4. Results**

##### *2-ME is dispensable for in vitro burn-injured T cell proliferation*

Accessory cells control T lymphocyte proliferation by maintaining a cysteine-rich extracellular environment and macrophage hyperactivity post-thermal injury was related to T-cell dysfunction [29]. As previously reported, intracellular thiol equilibrium is critical for T cell proliferation [3]. In order to evaluate T-cell dependency for low molecular weight thiols and to avoid any effect related to APC, we used purified T cells. Phenotyping analysis revealed that for both groups more than 98 % of isolated cells were T lymphocytes (Fig. 1A). Isolated T cells were cultured in complete RPMI media either with or without 2-ME supplementation to represent a cysteine-rich and -poor environment. Consistent with previous findings, T cells from sham-injured mice did not proliferate unless 2-ME was added to cell culture media (Fig. 1B). Furthermore, as previously reported, T-cell dysfunction in burn-injured mice was demonstrated by a reduction of their proliferation when cells were cultured in a cysteine-rich environment (Fig. 1B). Surprisingly, T cells from burn-injured mice were able to proliferate in a cysteine-poor environment at the same magnitude as when 2-ME was added to cell culture media (Fig. 1B). This shows that isolated T lymphocytes from burn-injured mice proliferate independent of 2-ME in a cystine-rich environment, which normally does not support T cell growth.

##### *Cell-cycle progression and CD25 up-regulation occur in burn-injured T cells*

Oxidative stress reduces the proliferation of T cells by interfering with the cellular events that lead to the transition from G0 to G1 phase of the cell cycle. In our previous experiment we observed increased  $^3\text{H}$ -thymidine uptake in stimulated T cells from burn-

injured mice when cultured in a cysteine-poor environment. Anti-CD3 stimulated T-cells from sham- and burn-injured mice were cultured in a cysteine-poor environment followed by evaluation of cell cycle analysis and IL-2R $\alpha$  (CD25) expression. Stimulated T lymphocytes from sham-injured mice were not able to proliferate in a cysteine-poor environment since less than 15 % of the cells were found in the phase S and G2/M following anti-CD3 stimulation. However, burn-injured T cells did proliferate in the same conditions with more than 31 % of these cells making the transition passed phase G0/G1 (Fig. 2A). Prior to activation, T cells from both sham- and burn-injured mice expressed low levels of CD25 (data not shown). Following anti-CD3 stimulation, CD25 up-regulation occurred in both groups and the magnitude was higher in proliferative T cells from burn-injured mice when compared to sham-injured mice (Fig. 2B). Thus, in the absence of 2-ME, only T cells from burn-injured animals completed each cell cycle phase. Conversely, T cells from sham-injured animals were blocked in phase G0/G1.

*Thermal injury induces system x<sub>c</sub>- expression in isolated T cells*

Since stimulated splenic T-cells from burn-injured mice proliferate in a cysteine-poor environment and the system x<sub>c</sub>- is responsible for the entry cystine into cells, we wished to determine if the components of the system x<sub>c</sub>- were expressed in T cells following a thermal injury. We first evaluated the expression of CD98, which was reported to be expressed in T cells [20]. As expected, freshly isolated T cells from sham- and burn-injured mice expressed low levels of CD98 [38]. Cells were stimulated and cultured in a cysteine-poor environment (without 2-ME). CD98 levels were later evaluated by flow cytometry. Results show that CD98 expression was up-regulated in stimulated cells with burn-injured T cells having the highest expression. Secondly, xCT expression was also

evaluated in stimulated T cells from sham- and burn-injured mice. Since the expression of xCT was never demonstrated in isolated T cells, we used HL-60 cells as positive control, which were reported to express xCT protein [39]. As expected, a band at 55 KDa was detected in HL-60 cell protein extract and represented xCT. In our model, freshly isolated T cells from sham- and burn-injured mice and stimulated T cells from sham-injured mice expressed low levels of xCT. On the contrary, stimulated T cells from burned mice expressed high levels of xCT. These results demonstrate that thermal injury induces up-regulation of the expression of both CD98 and xCT. This suggests that burn-injured T cells express system  $x_c^-$  and might be able to import cystine from the extracellular environment.

*T cells from burn-injured mice actively take up cystine via system  $x_c^-$*

To test the possibility that a functional system  $x_c^-$  existed in splenic T cells from burn-injured mice and was responsible for their proliferation in a cysteine-poor environment, we examined the uptake of  $^{14}\text{C}$ -cystine in stimulated T cells from sham- and burn-injured animals. We verified the influence of cystine uptake inhibition by SASP on T cell proliferation. Isolated T cells were stimulated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  of plate-bound coated anti-CD3 for 72 hours in L-cystine-free RPMI 1640 medium supplemented with  $^{14}\text{C}$ -cystine. In order to block cystine uptake, cells were also treated with 0.2 mM SASP for 30 minutes prior to stimulation and throughout the cell culture period. SASP was reported to specifically block system  $x_c^-$ . T cells from burn-injured mice were able to take up  $^{14}\text{C}$ -cystine and this effect was completely inhibited when cells were treated with system  $x_c^-$  inhibitor, SASP. T cell proliferation was also influenced by cystine uptake. As expected, only burn-injured T cells proliferated in the absence of 2-ME in cell culture media.

Inhibition of cystine uptake by SASP significantly decreased T cell proliferation from burn-injured mice. These results confirm that burn-injured T cells proliferate in (2-ME)-free cell culture media because they can actively import cystine from the extracellular environment. Furthermore, another mechanism must exist in order to explain the fact that the inhibition of cystine uptake did not completely eliminate the difference between sham- and burn-injured T cell proliferation.

*T cells from burn-injured mice exhibit higher intracellular ROS content but decreased apoptosis*

Since stimulated T cells from burn-injured mice were able to import cystine and this directly influenced their proliferation we next wanted to view if cystine transport was responsible for counteracting intracellular ROS generation following T cell stimulation. Cells from burn-injured mice had higher base levels of ROS and their stimulation increased the intracellular ROS content. However, system  $\alpha_c$ - inhibition did not further enhance ROS generation. Moreover, despite having higher intracellular ROS levels, T cells from burn-injured mice had lower apoptosis levels following their stimulation. Overall, these results suggests that cystine import does not serve to counteract ROS but enhance proliferation by allowing a greater number of cells to survive upon stimulation.

### **5. Discussion**

T cell immunosuppression following a thermal injury is widely documented in studies using *in vitro* cell culture systems and is characterized by decreased proliferation, IL-2 production, increased apoptosis and anergy [40-42]. Since normal T cells have weak membrane transport activity for the disulfide cystine, all of these studies have used cell-culture media supplemented with 2-ME [43] to facilitate the entry of cysteine into T cells

and their proliferation [44]. However, supplementation of cell culture media with 2-ME does not allow a proper evaluation of cysteine requirements in T cells. T cell dysfunction following thermal injury is related to macrophage hyperactivity. Given that cysteine delivery by APCs controls T lymphocyte activation and proliferation, we believe that a subtle change in T cells requirements for cysteine during thermal injury could influence their function [14,29]. In order to study T cell requirements for thiols we needed a system that prevented any cysteine derived from APC or conjugated to 2-ME to freely enter the cells. To represent a cysteine-rich and -poor environment, cell culture media was either supplemented with 2-ME or left without. As previously reported, we confirmed that the addition of 2-ME, resulted in a significant decrease of T cell proliferation from burn-injured mice when compared to sham-treated animals. Interestingly, we have found that *in vitro* stimulation of T cells from burn-injured mice leads to their proliferation in the absence of 2-ME supplementation. To our knowledge, it is the first study to demonstrate *in vitro* proliferation of murine lymphocytes in a cell culture media depleted of any source of thiols. Normal murine lymphocytes cultured in a medium lacking thiol-related compounds, L-cystine and GSH, failed to incorporate  $^3\text{H}$ -thymidine or to transition from G1 to S phase of the cell cycle [45]. However, burn-injured T cells progressed normally in S and G2/M phase while increasing CD25 expression. One reason for this could be that T lymphocytes from burn-injured mice have developed a mechanism to stimulate the entry of cystine present in cell culture media. One possible way could be by increasing the expression of system  $\text{x}_{\text{c}-}$ . In fact, thermal injury is characterized by cystinuria, high oxidative stress and a dramatic decrease in GSH plasmatic and cellular levels, all factors that contribute to  $\text{xCT}$  expression [46,47]. Moreover, thermal injury causes defects in T-cell signaling involving problems in  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization. A recent study demonstrated that

xCT expression in mouse fibroblasts could bypass the G1/S arrest induced by Ca<sup>2+</sup>-channel antagonists [48,49]. Also, a recent study demonstrated increased splenic xCT expression a murine model of endotoxemia and sepsis which is commonly associated with thermal injury [30]. Furthermore, in a recently published article the authors suggest that the expression of cystine/glutamate transporter mRNA in activated T lymphocytes induced by TCR triggering *in vitro*, would decrease their need for exogenous cysteine delivered by antigen-presenting cells occurring early after activation [50]. In our model, we were able to demonstrate that T cells from burn-injured mice had higher CD98 levels and expressed xCT. Moreover, these cells were able to actively import <sup>14</sup>C-cystine present in culture media which lead to their proliferation even when 2-ME was not added in the media. We were also able to demonstrate that system x<sub>c</sub>- activity could be specifically inhibited by SASP. This inhibitor has been previously used to decrease the proliferation of a pre-T cell NB2 lymphoma and also to inhibit cysteine secretion by tumor-associated somatic cells (macrophages, dendritic cells), leading to cysteine starvation of the tumor cells and apoptosis [51,52]. Interestingly, we were able to demonstrate that T cells from burn-injured mice treated with SASP were significantly less proliferative than untreated cells, confirming that cystine import by T cell from burn-injured mice was in part responsible for their proliferation. T cells from burn-injured mice exhibited higher intracellular ROS content which was further increased following their stimulation. SASP treatment of these cells did not further increase intracellular ROS levels suggesting that system x<sub>c</sub>- expression did not contribute to counteract ROS. Despite having higher intracellular content, T cells from burn-injured mice displayed less apoptosis following their stimulation. Furthermore, SASP did not completely decrease T cell proliferation suggesting that other mechanisms could be responsible for increasing intracellular thiols.

Another source of thiol could come from thioredoxin, a cytosolic enzyme with a redox-active disulfide within its active site that is secreted by lymphocytes upon activation [53]. Thioredoxin released by activated T cell from burn-injured mice could generate extracellularly small thiol compounds that in turn can be used by T cells. Interestingly, thioredoxin levels were found to be elevated in the plasma of burn patients on the day of injury and later from day 7 to day 9 post-burn injury [54].

This study is the first to demonstrate an active system  $x_c^-$  in T lymphocytes and confirms that intracellular thiol levels can regulate T cell activation and proliferation. This is particularly relevant in a situation where oxidative stress is elevated and GSH levels are decreased like in burn-injured patients. Moreover, xCT expression proved to contribute to *in vitro* T cell proliferation from thermally injured mice in a cystine-poor environment. Although we have observed activation and *in vitro* proliferation of burn-injured T cell in a less reducing environment, the generation of the immune response *in vivo* result from a much more complex cellular scheme. We could hypothesize that in optimal growth conditions as those defined by the *in vivo* stimulation of T cells by hyperactive APC in burn-injured subjects, their excessive release of cysteine combined to system  $x_c^-$ -expression on T cells would create an overstimulation situation. Thus, xCT expression may be deleterious for T cells *in vivo* and could contribute to their anergy in a situation where supra-optimal intracellular levels of cysteine are reached following their delivery by hyperactive APC.

### Acknowledgements

The present study was supported by a grant from the Fondation des Pompiers du Québec pour les Grands-Brûlés. Michele D'Elia and Julie Patenaude were supported by a research award from the FRSQ-Fondation de la Recherche en Santé du Québec.

### References

- [1] Pani G, Colavitti R, Borrello S, Galeotti T. Endogenous oxygen radicals modulate protein tyrosine phosphorylation and JNK-1 activation in lectin-stimulated thymocytes. *Biochem J* 2000; 347 Pt 1:173-81.
- [2] Devadas S, Zaritskaya L, Rhee SG, Oberley L, Williams MS. Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression. *J Exp Med* 2002; 195:59-70.
- [3] Hadzic T, Li L, Cheng N, Walsh SA, Spitz DR, Knudson CM. The role of low molecular weight thiols in T lymphocyte proliferation and IL-2 secretion. *J Immunol* 2005; 175:7965-72.
- [4] Hamilos DL, Zelarney P, Mascali JJ. Lymphocyte proliferation in glutathione-depleted lymphocytes: direct relationship between glutathione availability and the proliferative response. *Immunopharmacology* 1989; 18:223-35.
- [5] Walsh AC, Michaud SG, Malossi JA, Lawrence DA. Glutathione depletion in human T lymphocytes: analysis of activation-associated gene expression and the stress response. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; 133:249-61.

- [6] Fanger MW, Hart DA, Wells JV, Nisonoff A. Enhancement by reducing agents of the transformation of human and rabbit peripheral lymphocytes. *J Immunol* 1970; 105:1043-5.
- [7] Ishii T, Sugita Y, Bannai S. Regulation of glutathione levels in mouse spleen lymphocytes by transport of cysteine. *J Cell Physiol* 1987; 133:330-6.
- [8] Gmunder H, Eck HP, Benninghoff B, Roth S, Droege W. Macrophages regulate intracellular glutathione levels of lymphocytes. Evidence for an immunoregulatory role of cysteine. *Cell Immunol* 1990; 129:32-46.
- [9] Edinger AL, Thompson CB. Antigen-presenting cells control T cell proliferation by regulating amino acid availability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:1107-9.
- [10] Mansoor MA, Svardal AM, Schneede J, Ueland PM. Dynamic relation between reduced, oxidized, and protein-bound homocysteine and other thiol components in plasma during methionine loading in healthy men. *Clin Chem* 1992; 38:1316-21.
- [11] Bassi MT, Gasol E, Manzoni M, Pineda M, Riboni M, Martin R, et al. Identification and characterisation of human xCT that co-expresses, with 4F2 heavy chain, the amino acid transport activity system xc-. *Pflugers Arch* 2001; 442:286-96.
- [12] Gmunder H, Eck HP, Droege W. Low membrane transport activity for cystine in resting and mitogenically stimulated human lymphocyte preparations and human T cell clones. *Eur J Biochem* 1991; 201:113-7.
- [13] Eagle H, Washington C, Friedman SM. The synthesis of homocystine, cystathionine, and cystine by cultured diploid and heteroploid human cells. *Proc Natl*

Acad Sci U S A 1966; 56:156-63.

- [14] Angelini G, Gardella S, Ardy M, Ciriolo MR, Filomeni G, Di Trapani G, et al. Antigen-presenting dendritic cells provide the reducing extracellular microenvironment required for T lymphocyte activation. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99:1491-6.
- [15] Bannai S. Induction of cystine and glutamate transport activity in human fibroblasts by diethyl maleate and other electrophilic agents. J Biol Chem 1984; 259:2435-40.
- [16] Bannai S, Sato H, Ishii T, Sugita Y. Induction of cystine transport activity in human fibroblasts by oxygen. J Biol Chem 1989; 264:18480-4.
- [17] Bannai S, Sato H, Ishii T, Taketani S. Enhancement of glutathione levels in mouse peritoneal macrophages by sodium arsenite, cadmium chloride and glucose/glucose oxidase. Biochim Biophys Acta 1991; 1092:175-9.
- [18] Sato H, Fujiwara K, Sagara J, Bannai S. Induction of cystine transport activity in mouse peritoneal macrophages by bacterial lipopolysaccharide. Biochem J 1995; 310 (Pt 2):547-51.
- [19] Sato H, Nomura S, Maebara K, Sato K, Tamba M, Bannai S. Transcriptional control of cystine/glutamate transporter gene by amino acid deprivation. Biochem Biophys Res Commun 2004; 325:109-16.
- [20] Iwata S, Hori T, Sato N, Ueda-Taniguchi Y, Yamabe T, Nakamura H, et al. Thiol-mediated redox regulation of lymphocyte proliferation. Possible involvement of adult T cell leukemia-derived factor and glutathione in transferrin receptor expression. J Immunol 1994; 152:5633-42.

- [21] Click RE, Benck L, Alter BJ. Enhancement of antibody synthesis in vitro by mercaptoethanol. *Cell Immunol* 1972; 3:156-60.
- [22] Chen C, Hirsch JG. Restoration of antibody-forming capacity in cultures of nonadherent spleen cells by mercaptoethanol. *Science* 1972; 176:60-1.
- [23] Ohmori H, Yamamoto I. A mechanism of the augmentation of antibody response in vitro by 2-mercaptopethanol: facilitation of cystine uptake in murine lymphocytes. *Int J Immunopharmacol* 1982; 4:475-9.
- [24] Lemke H, Opitz HG. Function of 2-mercaptopethanol as a macrophage substitute in the primary immune response in vitro. *J Immunol* 1976; 117:388-95.
- [25] Nordin AA. The in vitro immune response to a T-independent antigen. I. The effect of macrophages and 2-mercaptopethanol. *Eur J Immunol* 1978; 8:776-81.
- [26] Zmuda J, Friedenson B. Changes in intracellular glutathione levels in stimulated and unstimulated lymphocytes in the presence of 2-mercaptopethanol or cysteine. *J Immunol* 1983; 130:362-4.
- [27] Smyth MJ. Glutathione modulates activation-dependent proliferation of human peripheral blood lymphocyte populations without regulating their activated function. *J Immunol* 1991; 146:1921-7.
- [28] Bertin-Maghit M, Goudable J, Dalmas E, Steghens JP, Bouchard C, Gueugniaud PY, et al. Time course of oxidative stress after major burns. *Intensive Care Med* 2000; 26:800-3.

- [29] Schwacha MG. Macrophages and post-burn immune dysfunction. *Burns* 2003; 29:1-14.
- [30] Taguchi K, Tamba M, Bannai S, Sato H. Induction of cystine/glutamate transporter in bacterial lipopolysaccharide induced endotoxemia in mice. *J Inflamm (Lond)* 2007; 4:20
- [31] Horton JW. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology* 2003; 189:75-88.
- [32] Ocal K, Avlan D, Cinel I, Unlu A, Ozturk C, Yaylak F, et al. The effect of N-acetylcysteine on oxidative stress in intestine and bacterial translocation after thermal injury. *Burns* 2004; 30:778-84.
- [33] Cetinkale O, Senel O, Bulan R. The effect of antioxidant therapy on cell-mediated immunity following burn injury in an animal model. *Burns* 1999; 25:113-8.
- [34] Gout PW, Buckley AR, Simms CR, Bruchovsky N. Sulfasalazine, a potent suppressor of lymphoma growth by inhibition of the x(c)- cystine transporter: a new action for an old drug. *Leukemia* 2001; 15:1633-40.
- [35] Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmid RM. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest* 1998; 101:1163-74.
- [36] D'Elia M, Patenaude J, Hamelin C, Garrel DR, Bernier J. Corticosterone binding globulin regulation and thymus changes after thermal injury in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288:E852-60.

- [37] Bannai S, Kitamura E. Adaptive enhancement of cystine and glutamate uptake in human diploid fibroblasts in culture. *Biochim Biophys Acta* 1982; 721:1-10.
- [38] Lindsten T, June CH, Thompson CB, Leiden JM. Regulation of 4F2 heavy-chain gene expression during normal human T-cell activation can be mediated by multiple distinct molecular mechanisms. *Mol Cell Biol* 1988; 8:3820-6.
- [39] Huang Y, Dai Z, Barbacioru C, Sadec W. Cystine-glutamate transporter SLC7A11 in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res* 2005; 65:7446-54.
- [40] De AK, Kodys KM, Pellegrini J, Yeh B, Furse RK, Bankey P, et al. Induction of global anergy rather than inhibitory Th2 lymphokines mediates posttrauma T cell immunodepression. *Clin Immunol* 2000; 96:52-66.
- [41] Sparkes BG. Mechanisms of immune failure in burn injury. *Vaccine* 1993; 11:504-10.
- [42] Teodorczyk-Injeyan JA, Sparkes BG, Mills GB, Peters WJ, Falk RE. Impairment of T cell activation in burn patients: a possible mechanism of thermal injury-induced immunosuppression. *Clin Exp Immunol* 1986; 65:570-81.
- [43] Zang Y, Dolan SM, Ni Choileain N, Kriynovich SJ, Murphy TJ, Sayles P, et al. Burn injury initiates a shift in superantigen-induced T cell responses and host survival. *J Immunol* 2004; 172:4883-92.
- [44] Choudhry MA, Fazal N, Goto M, Gamelli RL, Sayeed MM. Gut-associated lymphoid T cell suppression enhances bacterial translocation in alcohol and burn injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282:G937-47.

- [45] Yamauchi A, Bloom ET. Control of cell cycle progression in human natural killer cells through redox regulation of expression and phosphorylation of retinoblastoma gene product protein. *Blood* 1997; 89:4092-9.
- [46] Stinnett JD, Alexander JW, Watanabe C, MacMillan BG, Fischer JE, Morris MJ, et al. Plasma and skeletal muscle amino acids following severe burn injury in patients and experimental animals. *Ann Surg* 1982; 195:75-89.
- [47] Sato H, Shiiya A, Kimata M, Maebara K, Tamba M, Sakakura Y, et al. Redox imbalance in cystine/glutamate transporter-deficient mice. *J Biol Chem* 2005; 280:37423-9.
- [48] Sayeed MM. Alterations in cell signaling and related effector functions in T lymphocytes in burn/trauma/septic injuries. *Shock* 1996; 5:157-66.
- [49] Lastro M, Kourtidis A, Farley K, Conklin DS. xCT expression reduces the early cell cycle requirement for calcium signaling. *Cell Signal* 2007;
- [50] Castellani P, Angelini G, Delfino L, Matucci A, Rubartelli A. The thiol redox state of lymphoid organs is modified by immunization: role of different immune cell populations. *Eur J Immunol*. 2008; 38:2419-25.
- [51] Gout PW, Kang YJ, Buckley DJ, Bruchovsky N, Buckley AR. Increased cystine uptake capability associated with malignant progression of Nb2 lymphoma cells. *Leukemia* 1997; 11:1329-37.
- [52] Gout PW, Simms CR, Robertson MC. In vitro studies on the lymphoma growth-

inhibitory activity of sulfasalazine. *Anticancer Drugs* 2003; 14:21-9.

[53] Kondo N, Ishii Y, Son A, Sakakura-Nishiyama J, Kwon YW, Tanito M, et al. Cysteine-dependent immune regulation by TRX and MIF/GIF family proteins. *Immunol Lett* 2004; 92:143-7.

[54] Abdiu A, Nakamura H, Sahaf B, Yodoi J, Holmgren A, Rosen A. Thioredoxin blood level increases after severe burn injury. *Antioxid Redox Signal* 2000; 2:707-16.

**Legend of figures**

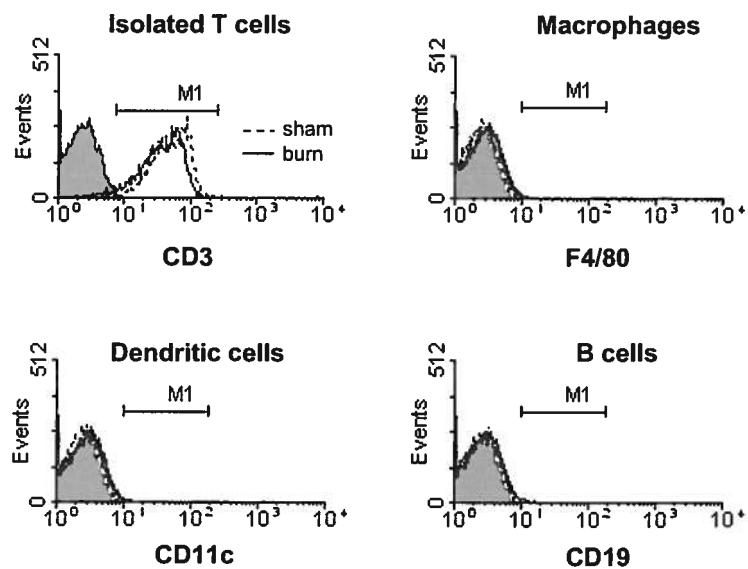
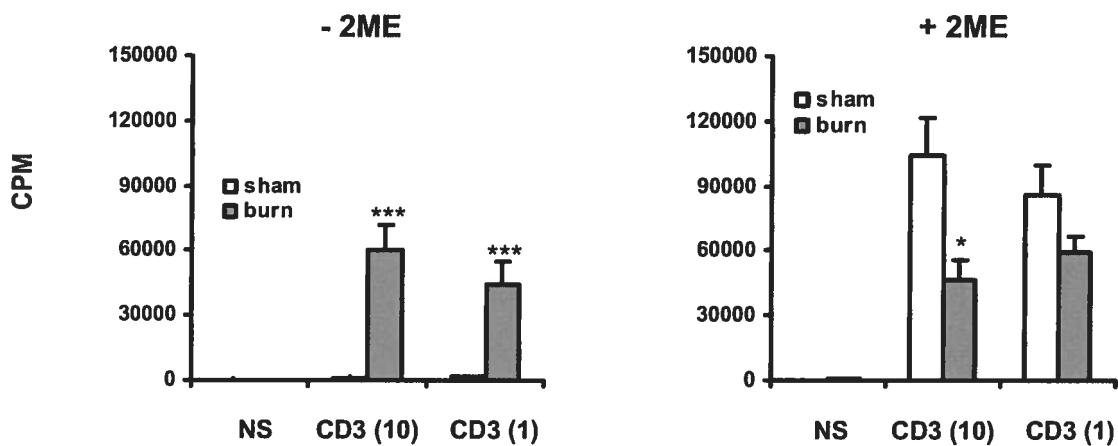
**Figure 1.** A) T cells were isolated using MACS microbeads and cell purity was confirmed by phenotyping analysis. B) Splenic Isolated T cells from burn-injured mice proliferate in absence of 2-ME but are less proliferative than T cells from sham-injured mice when 2-ME is added to culture media. Cells were harvested at day 10 post-burn injury and cultured as described in the material and methods section. Proliferative responses are shown as counts per minute. Data represent mean values of CPM in pooled T cells +/- SEM ( $n = 8$  mice per group; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ). Data are representative of three independent experiments.

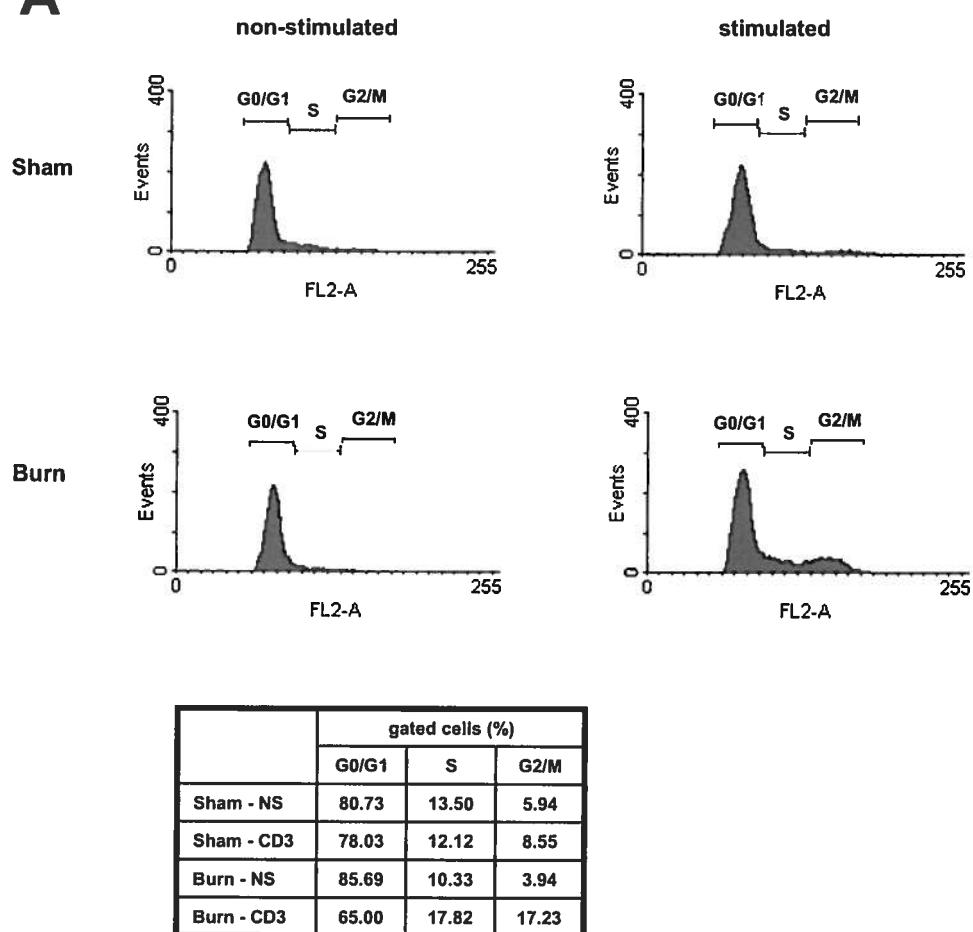
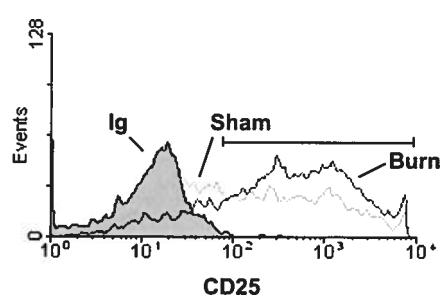
**Figure 2.** Stimulated splenic T cells from burn-injured mice cultured in 2-ME deprived media are less susceptible to activation-induced cell death (A) and express higher levels of CD25 (B) when compared with stimulated T cell isolated from sham-injured mice. Cells were harvested and isolated at day 10 post-burn injury and cultured as described in the material and methods section.  $1 \times 10^6$  cells were stained with propidium iodide and cell cycle was analysed by flow cytometry. CD25 expression was also analysed by flow cytometry using PE-conjugated anti-mouse CD25.

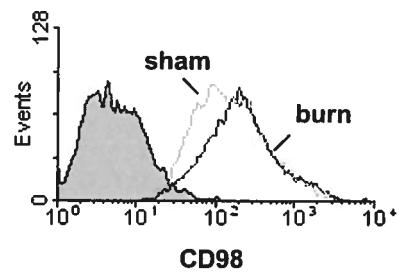
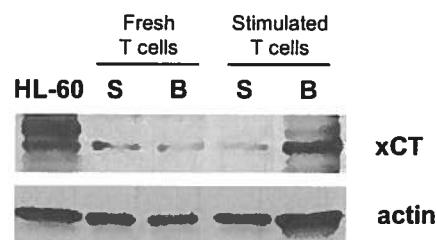
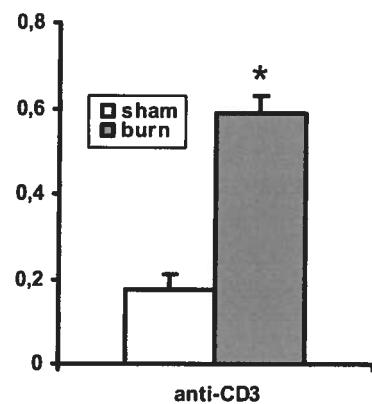
**Figure 3.** Splenic T cells from burn-injured mice express high levels of system  $x_c^-$ -components, CD98 in (A) and xCT in (B) when compared with T cell isolated from sham-injured mice. Cells were harvested and isolated at day 10 post-burn injury and cultured ( $2 \times 10^6$  cells/well in 24-well plates) in 2-ME deprived culture media. Cells were stimulated for 72h with plate-bound anti-CD3 antibody (10 $\mu$ g/ml). CD98 expression was analysed by flow cytometry. xCT expression was assayed on fresh isolated T cells and anti-CD3 stimulated T cells by Western blot using polyclonal rabbit anti-xCT antibody. HL-60 cell extract was used as positive control for xCT protein. One representative experiment out of three is shown. xCT expression in activated T cells is increased in burn-injured mice. Results were normalized to actin and shown graphically (C) (+/- SEM) \*, ( $p < 0.05$ ).

**Figure 4.**  $^{14}\text{C}$ -Cystine uptake is higher in splenic T cells isolated from burn-injured mice than in T cells isolated for sham-injured mice (A). Inhibition of system  $x_c^-$  decreased cystine uptake and proliferation of T cells isolated from burn-injured mice (B). Cells were harvested at day 10 post-burn injury and cultured as described in material and methods section. SASP (0.2 mM) was used to inhibit system  $x_c^-$  activity. Both  $^{14}\text{C}$ -Cystine uptake and proliferative responses are shown as counts per minute. Data represent mean values of CPM in pooled T cells +/- SEM ( $n = 8$  mice per group; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ). Data are representative of three independent experiments.

**Figure 5.** Total intracellular ROS levels are higher in splenic T cells isolated from burn-injured mice and are not influenced by system  $x_c$ - inhibition (A). Despite higher ROS levels, T cells from burn-injured mice show less apoptosis following anti-CD3 stimulation (B). Cells were harvested at day 10 post-burn injury and cultured as described in material and methods section. SASP (0.2 mM) was used to inhibit system  $x_c$ - activity. Total ROS and apoptosis were evaluated by FACS analysis as described in material and methods section. For ROS determination, data represent Gmean values of ROS from pooled T cells +/- SEM ( $n = 8$  mice per group; \*,  $p < 0,05$ ). Data are representative of three independent experiments.

**A****B****Figure 1**

**A****B****Figure 2**

**A****B****C****Figure 3**

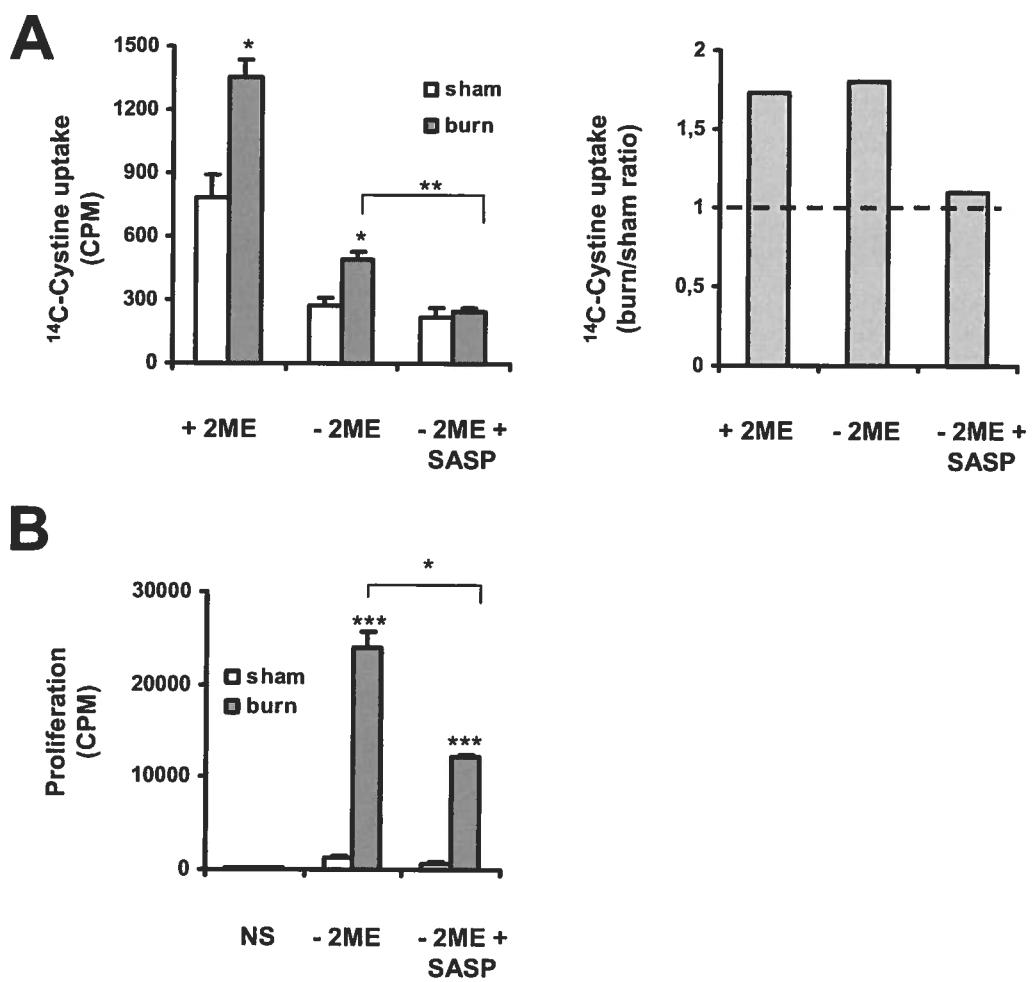
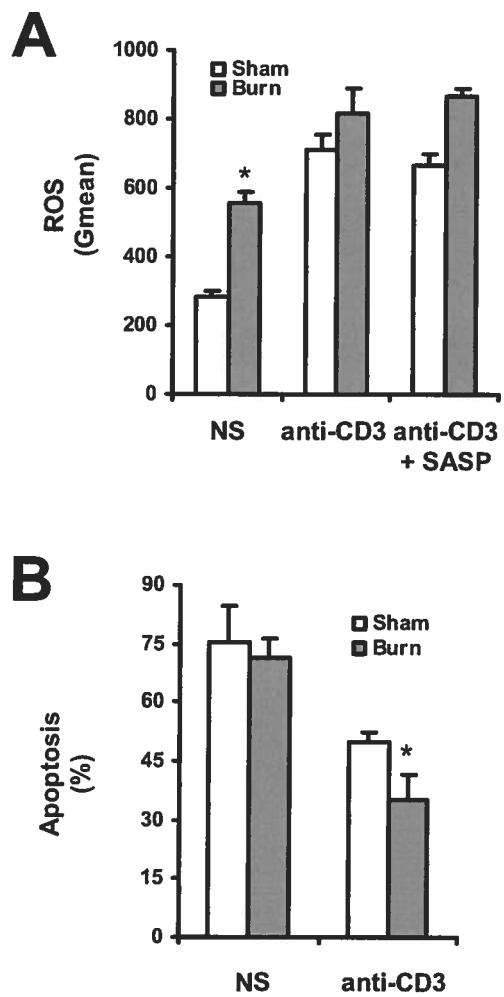


Figure 4



**Figure 5**

## **Chapitre 5 : Article III**

---

### Mise en contexte

---

La production de glucocorticoïdes (GC) est très importante en réponse au stress de la brûlure et de nombreuses études ont démontré divers effets sur le système immunitaire {D'Elia, Patenaude, et al. 2005}; {Fukuzuka, Edwards, et al. 2000}. La manière dont les GC agissent sur les lymphocytes T dépend de leur stade de maturation et de leur niveau d'activité {Nijhuis, Hinloopen, et al. 1995}. Les GC exercent une activité immuno-modulatrice puisqu'ils peuvent favoriser ou réprimer les réponses associées aux cellules T. À faible dose, les GC augmentent l'expression de la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2 et du co-récepteur CD4 et favorisent l'activation des cellules T stimulées {Wiegers, Labey, et al. 1995}; {Wiegers, Stec, et al. 2000}. Toutefois, à forte dose, les GC réduisent la prolifération, inhibe la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  et favorisent les réponses immunitaires associées aux lymphocytes T de type Th2 {Redondo, Fresno, et al. 1988}; {Paliogianni, Raptis, et al. 1993}; {Miyaura & Iwata 2002}.

Une précédente étude menée dans notre laboratoire a démontré une forte activation des lymphocytes T dans la rate de souris au jour 10 post-brûlure {Patenaude, D'Elia, et al. 2005}. Or, l'activation des cellules T se traduit par une stimulation des voies de signalisation intracellulaire, entre autres les voies des protéines mitogen-activated protein kinases (MAPK) telles que ERK 1/2, JNK et p38 {Dong, Davis, et al. 2002}. Cette dernière kinase peut être activée lorsqu'un lymphocyte T est stimulé via le TCR/CD3 et d'autant plus lorsque la stimulation implique le CD28. De plus, p38 peut être activée par l'IL-2 ou IL-7. La voie de la p38 MAPK contrôle chez les lymphocytes T la production des cytokines IFN- $\gamma$ , IL-2 et IL-10 de même que la prolifération cellulaire et l'apoptose {Rincon & Pedraza-Alva 2003}. Ainsi, l'activation de la p38 est intimement liée aux réponses cellulaires de type Th1, à la différentiation des cellules T en cellules T auxiliaires CD4+ et favorise la production d'IFN- $\gamma$  lorsque ces cellules sont activées en présence d'IL-12 et d'IL-18 {Rincon, Enslen, et al. 1998}. D'ailleurs, une diminution de l'activité de la p38 MAPK via l'utilisation d'un inhibiteur spécifique, le SB203580, n'a que très peu d'effet sur la production d'IL-2 et la prolifération des lymphocytes T mais

diminue fortement la synthèse de plusieurs autres cytokines telles que : IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 et le TNF- $\alpha$  {Koprak, Staruch, et al. 1999}.

Au niveau cellulaire, divers mécanismes entraînent une baisse de la sensibilité aux GC. La réduction de l'expression du GR, une diminution de l'affinité du ligand pour le GR, une baisse de la liaison du GR à l'ADN et l'activité des MAPK peuvent mener à une perte de sensibilité aux hormones de stress {Adcock 2000}. Les récents travaux d'Irusen et collègues (2002) ont démontré que la phosphorylation du GR par la p38 MAPK dans les PBMC de patients asthmatiques résistants aux traitements corticostéroïdiens était responsable d'une baisse de la sensibilité de ces cellules au dexamethasone {Irusen, Matthews, et al. 2002}. De plus, certaines données suggèrent que la phosphorylation du GR en des sites (serines 203, 211 et 226) situés dans la région amino-terminale de la protéine serait importante pour sa fonction. La phosphorylation en ser-203 est nécessaire pour le repliement adéquat du récepteur et sa séquestration dans le cytoplasme tandis qu'une phosphorylation de la ser-211 permet au récepteur de lier son ligand et de se transférer dans le noyau {Wang, Frederick, et al. 2002}. De plus, Szatmary et collègues (2004) ont découvert un nouveau site de phosphorylation au niveau du domaine de liaison au ligand (entre le acide aminés 525 à 795) et confirmé que la suppression de l'activité du GR par la p38 MAPK activée est un mécanisme physiologiquement important expliquant la résistance aux GC observée chez divers patients victimes de maladies inflammatoires chroniques {Szatmary, Garabedian, et al. 2004}.

À ce jour, tous les travaux de recherche ayant porté sur la résistance aux GC ont répertorié ce phénomène lors d'une exposition chronique aux hormones de stress. Le but de cette étude était de vérifier si un événement ponctuel, telle la brûlure sévère, pouvait causer un phénomène de résistance aux GC.

Plus spécifiquement, nous voulions examiner si :

- i) la sensibilité aux GC est modifiée chez les lymphocytes T spléniques 10 jours suivant une brûlure sévère;

- ii) l'expression de la p38 MAPK et de sa forme phosphorylée est modifiée chez les lymphocytes T spléniques au jour 10 post-brûlure;
- iii) l'inhibition de l'activité de la p38 MAPK permet de normaliser la production d'IFN- $\gamma$ , d'IL-2 et la prolifération des lymphocytes T de souris brûlées.

---

**Résumé français****p38 MAPK activity in splenic T cells is responsible for glucocorticoids resistance observed in thermally-injured mice.**

Michele D'Elia, Julie Patenaude, Charles Dupras et Jacques Bernier

Institut National de la Recherche Scientifique - Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boul. des Prairies, Laval, H7V 1B7, Canada.

Les glucocorticoïdes (GC) sont des hormones de stress dont la production est importante chez les grands-brûlés et utilisées en clinique pour diminuer la réponse inflammatoire. Les lymphocytes T sont sensibles à l'action des GC, mais acquièrent une certaine résistance suivant leur activation. L'hyperactivité des lymphocytes T visible lors de la brûlure sévère peut conduire à une dysfonction du système immunitaire. Dans cette étude, nous voulions évaluer en premier lieu, la sensibilité aux GC des lymphocytes T isolés de la rate de souris brûlées et en second lieu, l'acquisition d'un phénomène de résistance au GC chez ces mêmes cellules. Finalement, nous voulions identifier les mécanismes responsables de cette résistance. Nous avions émis l'hypothèse que le phénomène de résistance aux GC serait dû à une augmentation de l'activité de la protéine p38 mitogen-activated kinase (MAPK). Pour démontrer ce fait, des souris mâles C57BL/6 âgées entre 6-8 semaines ont été assignées dans deux groupes : témoin et brûlure. Une brûlure du 3<sup>e</sup> degré fut infligée aux souris de ce groupe. Les lymphocytes T furent isolés des rates de souris témoins et brûlées 10 jours suivant le traumatisme et nous avons par la suite vérifié

l'effet des GC sur ces cellules. Les niveaux d'expression du récepteur à glucocorticoïdes (GR), l'apoptose des cellules T exposées aux GC, l'effet des GC sur la prolifération des cellules T stimulées, leur production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ , les niveaux de phosphorylation de la protéine p38 MAPK ainsi que l'inhibition pharmacologique de la p38 MAPK sur les paramètres mentionnés plus haut ont tous été étudiés. Les résultats montrent que malgré l'augmentation du GR observée chez les lymphocytes T au jour 10 post-brûlure, ces cellules sont plus résistantes à l'apoptose induite par les GC. *In vitro*, nous avons remarqué une forte prolifération des cellules T provenant de souris brûlées, une résistance à l'effet anti-prolifératif des GC, l'augmentation du récepteur à IL-2, une forte production IFN- $\gamma$ , des niveaux de phosphorylation élevés de p38 MAPK et une normalisation des effets des GC sur les cellules T de souris brûlées lorsque la p38 MAPK fut inhibée par l'exposition des cellules à l'inhibiteur pharmacologique SB203580.

Cette étude démontre pour la première fois qu'un événement ponctuel, telle la brûlure sévère, conduit à une résistance aux GC au niveau des lymphocytes T de la rate et permet de cibler la p38 MAPK comme un élément essentiel de ce mécanisme.

\* Article soumis pour publication à *Critical Care Medicine*

### Contributions des auteurs

---

Les manipulations des souris lors des journées d'application du choc thermique et de sacrifice de même que la préparation des organes et l'isolation des cellules ont été effectuées avec l'aide de ma collègue de laboratoire, Julie Patenaude. Par la suite, j'ai réalisé toutes les expériences décrites dans cet article, sauf l'immunobuvardage Western de MKP-1 fait par Charles Dupras. J'ai entièrement rédigé le manuscrit, avant de le remettre au Dr Bernier, qui l'a lu, corrigé et soumis au journal.

**p38 MAPK activity in splenic T cells is responsible  
for glucocorticoid resistance observed in thermally-  
injured mice**

---

**p38 MAPK activity in splenic T cells is responsible for glucocorticoids resistance observed in thermally-injured mice.**

Michele D'Elia MSc<sup>1</sup>, Julie Patenaude MSc<sup>1</sup>, Charles Dupras BSc<sup>1</sup> and Jacques Bernier PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Recherche Scientifique - Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada,

**Contact information :** Jacques Bernier, PhD  
Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier,  
531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7  
Tel: (450) 687-5010 (ext.8813)  
FAX: (450) 686-5501  
e-mail: jacques.bernier@iaf.inrs.ca

**Funding:** The present study was supported by a grant from the Fondation des POMPIERS du Québec pour les Grands-Brûlés. Michele D'Elia and Julie Patenaude were supported by a research award from the FRSQ-Fondation de la Recherche en Santé du Québec.

**Key Words :** Splenic T cells, Glucocorticoids, Corticosterone, Burn injury, p38 MAPK

**Objective:** T lymphocytes are sensitive to glucocorticoids (GCs) but become more resistant to GCs when they are activated. Hyperactive T cells can lead to immune dysfunction following thermal injury. In the present study our objective was to evaluate if splenic T cells become resistant to GCs following thermal injury and to identify the possible mechanisms underlying this resistance. One mechanism that we hypothesized is p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) increased activity that could lead to GCs resistance.

**Design:** Randomized controlled laboratory study

**Setting:** Central animal facility and research laboratory

**Subjects:** Male C57BL/6 mice (6-8 weeks) were randomly assigned to sham or burn injury treatment.

**Interventions:** Burn-injured mice were given a 20% total body surface area partial thickness burn and splenic T cells were isolated 10 days later.

**Results:** Glucocorticoid receptor (GR) and heat shock protein (HSP) levels in splenic T cells were evaluated and GR was found to be higher in burn-injured T cells compared to controls. GC-induced apoptosis was also evaluated before and following T lymphocyte stimulation and cells from burn-injured mice were less sensitive. Proliferation of burn-injured splenic T cells induced by plate-bound anti-CD3 was significantly higher and resisted to corticosterone (CORT) suppressive effect. GR levels were lower in anti-CD3 stimulated burn-injured T cells. Phosphorylated form of p38 MAPK protein was highly expressed in stimulated splenic burn-injured T cells and was resistant to CORT suppressive effect. Reducing p38 activity pharmacologically using SB203580, a specific p38 MAPK inhibitor, decreased cell proliferation and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) production to control levels.

**Conclusions:** These findings suggest that splenic T-cells isolated from burn-injured mice at day-10 post-thermal injury have developed a resistance to GC. We have identified p38 MAPK as a key modulator of this resistance. Pharmacological inhibition using SB203580 proved to be successful in reducing burn-injured T cells proliferation and IFN- $\gamma$  production.

## INTRODUCTION

Endogenous glucocorticoids (GCs) hormones are highly produced following thermal injury. Several studies have reported a role of GCs released in response to trauma injury and their effects on the immune system (1-5). They exert their action by suppressing both innate and acquired immunity and by inhibiting the production of pro-inflammatory mediators (6). T lymphocytes are a major sensitive target for GC action on acquired immunity. Their effects on these cells are more complex and depend on their state of differentiation or activation (7). Indeed, GCs can act positively or negatively on T-cell mediated response. Positively, they increase cytokine receptor levels (8) and TcR-induced CD4 expression (9) thus accelerating T-cell activation. Negatively, GCs counteract T-cell activity by promoting their apoptosis (10), reducing proliferation (11), inhibiting IL-2 and IFN- $\gamma$  production. Later events cause a shift in T-cell mediated response from Th1 to Th2 phenotype (12). Th1 cells are required to conduct cell-mediated inflammatory response involving the production of IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-6 (13). On the other hand, Th2 cells secrete IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 which support B-cell activation and counteract inflammatory processes (14). Normal T-cell activation leads to increased intracellular signaling mediated by mitogen-activated protein kinases (MAPKs) such as ERK 1/2, JNK and p38 (15). p38 MAPK can be activated by multiple stimuli such as pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , lipopolysaccharide and environmental stress in the extracellular milieu (heat, UV radiation, osmotic and oxydative stress) (16). It is established that p38 is activated by TCR/CD3 triggering alone (17);(18) or in synergy with CD28 cross-linking (19). Moreover, p38 can be activated in response to IL-2 and IL-7 (20). p38 MAPK is implicated in different type of responses involving the expression of several cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-10), cell proliferation and the induction of

apoptosis (15). Regarding genotype of T cells, p38 activation is closely related to Th1 response in committed CD4<sup>+</sup> T cells (16). p38 induces IFN- $\gamma$  expression when these cells are activated in presence of IL-12 and IL-18 while being dispensable for Th1 commitment and development itself (21). The role of p38 is not restricted to Th1-mediated response since the inhibition of p38 MAPK activity in activated T cells using SB203580, a specific p38 MAPK inhibitor reduced the production of several other cytokines such as IL-4, IL-5 and IL-10 (22). Conversely, the expression of MKK6, a constitutive activator of p38 MAPK, caused increased IFN- $\gamma$  expression in transgenic mice (23).

Only few studies have evaluated modulation in MAPK expression or activity following burn injury and all of them have been interested in the early immune response going up to day-3 post-burn. Choudhry and colleagues (24) have reported decreased ERK 1/2 and p38 MAPK activity in anti-CD3 stimulated T cells isolated from rat mesenteric lymph node at day-2 post-burn. They also noted decreased T cell proliferation associated with reduced MAPK activity. Other studies showed a perturbation of Ca<sup>2+</sup> mobilization in T cell isolated from burn-injured animals resulting in attenuated MAPK (ERK 1/2 and p38) activation (25). Li et al. (26) have associated high CORT levels present in burn-injured rat at days 1 and 2 post-injury to be responsible for decreased ERK 1/2 and p38 MAPK activity resulting in down-regulated IL-2 production and cell proliferation. Later results were confirmed by inhibition of CORT synthesis which led to a normal MAPK activity, IL-2 production and T cell proliferation.

In several inflammatory diseases, resistance to GC was demonstrated (1). Resistance to the anti-inflammatory effects of GCs can be induced by several mechanisms: reduced number of glucocorticoid receptors (GR), altered affinity of the ligand for GRs, reduced ability of the GR to bind to DNA by post-transcriptional modification (1). Among candidates to mediate the latter event, MAPKs were identified. Recently, Irusen et al. (27) have demonstrated that phosphorylation of the GR mediated by p38 MAPK, is associated with reduced responsiveness to dexamethasone in PBMCs from patient with steroid-resistant asthma. Another study showed that IL-2-induced steroid resistance could be blocked by an inhibitor of JNK (28). Data from in vitro studies showed that phosphorylation sites in the amino-terminal region of the GR (at serines 203, 211 and 226) play a critical role in GR function (29). Serine-203 phosphorylation is necessary for proper GR folding and its sequestration in the cytoplasm while serine-211 is phosphorylated when cells are treated with GR agonist and results in nuclear translocation of the receptor (29). It was demonstrated in lymphoid cells that p38 MAPK phosphorylation of the GR at Ser-211 was a key mediator for glucocorticoid-induced apoptosis (30). Phosphorylation at serine 226 by JNK but not p38 has been shown to inhibit GR-mediated transcriptional activation, thus leading to GCs unresponsiveness (31). Sousa *et al.* (32) have demonstrated increased JNK phosphorylation in corticosteroid-resistant asthmatic patients. Recently, Szatmary et al (33), have confirmed that suppression of GR function by activated p38 and JNK MAPK are physiologically important mechanism for GC resistance in patients with chronic inflammatory disease. Their study showed that the main target of the p38 MAPK-mediated GC inhibition is the ligand-binding domain of GR (spanning amino acids 525-795).

In responsive cells, GCs repress p38 MAPK by promoting the dual MAPK phosphatase 1 (MKP-1) expression which dephosphorylate p38 and attenuates activation (34)-(35). It was established that GC-induced expression of MKP-1 in Hela cells (34), in rat mast cell line (36) and in mouse macrophage cell line (37). MKP-1 expression was increased by dexamethasone in arthritic patient isolated fibroblast-like synoviocytes and was associated with inhibition of p38 MAPK phosphorylation and IL-6 production (38). This suggests that MKP-1 expression might play a role in the suppression of inflammation by GCs. Consequently, an initial defect in GC-induced MKP-1 expression or activity might increase MAPK activity, impairing GR function and further inhibiting the induction of MKP-1 expression (35).

Here, we report that isolated splenic T cells from burn-injured mice are resistant to GCs at day-10 post-burn. Decreased GC sensitivity is mediated by T cell activation and high p38 MAPK activity. In addition to previous findings demonstrating that GC resistance in T cells followed chronic inflammatory disease or long-term CORT exposition we explain that a unique event, like thermal injury can induce GC resistance and that inhibition of p38 MAPK can restore GC sensitivity.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals and burn injury*

All experiments were performed on 6-week-old male mice: C57BL/6 (Charles River Laboratories, St-Constant, Quebec, Canada). The mice were acclimatized for a period of 2 weeks prior to the initiation of any procedures and were housed in a central animal facility under strictly controlled temperature, relative humidity and a 12-h light/dark

cycle. They were kept in cages, each containing five mice. Standard chow (Richmond Standard Lab Diet; Lab Diet, Richmond, IN, USA) and water were provided *ad libitum*. The Institutional Animal Care Committee reviewed and approved all procedures performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines. Mice were subjected to a 20 % total body surface area burn (TBSA) as described before (39). Briefly, mice were randomly assigned to a control or burn group, each containing 8 animals. After anaesthesia, shaving of the dorsum, animals were placed in a mold and immersed for 7 s in water at 90 °C to produce a full thickness to cover 20%. The sham group was immersed in water at room temperature (22 °C). Both sham- and burn-injured mice were resuscitated after the procedure with 2 ml of saline given i.p. containing buprenorphine. Flamazine (Smith & Nephew, Montreal, Quebec, Canada), a topical antiseptic cream, was directly applied on the wound to reduce the risk of infection.

#### *T cells preparation*

On day 10 after treatment, the animals were anaesthetised. Spleen were removed and prepared individually as single-cell suspensions by digestion with Collagenase D (1mg/ml)/Dnase (20 $\mu$ g/ml) (Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canada) solution in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). The suspensions were washed three times in HBSS and depleted of red blood cells by osmotic shock in Gey's solution supplemented with 0.155M NH<sub>4</sub>Cl. The cells were resuspended in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), and antibiotic solution (100 IU/ml penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin; Sigma-Aldrich). Cell viability was determined by trypan blue exclusion and was

consistently greater than 90%. T cells were purified from mouse spleen cell suspensions using MACS separation column system with Pan T cell isolation kit (Miltenyi biotec, Auburn, CA, USA). The purity of the obtained isolated T cells was determined by flow cytometry using anti-mouse CD3 FITC-conjugated and was reproducibly higher than 95 %.

#### *Apoptosis determination*

T cell apoptosis was evaluated by quantifying DNA sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> events in cell cycle as described before (40). Briefly, 1x10<sup>6</sup> isolated T cells from sham- and burn-injured mice were cultured in 24-well plates in complete RPMI supplemented with 10% FCS (Sigma-Aldrich) for 24h in presence of increasing concentrations of CORT (10<sup>-6</sup> to 10<sup>-8</sup> M). Control samples and cells were treated or not with RU-486 (Sigma-Aldrich) a GR inhibitor, 30 minutes prior to CORT exposition. Following culture, cells were collected and washed 2 times with PBS. Then, the pellet was resuspended in 300µl of Krishan Buffer, an hypotonic fluorochrome solution (50µg/ml propidium iodine in 0.1% sodium citrate and 0.1% Triton X-100). 10 µg of RNase was added and incubated in the dark at 37°C for 1 hour. Apoptosis was quantified by flow cytometry on a FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson) by measuring % cells in phase sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Ten thousand cells were analyzed for each test.

#### *In vitro proliferation assay*

For lymphocytes proliferation studies, Anti-CD3 (clone 17A2; eBioscience) coated 96-well flat-bottom tissue culture plates were prepared by adding 100µl per well of the diluted antibody (10 or 1 µg/ml) in PBS and by incubating the plates overnight at 4°C.

The plates were washed three times with PBS prior to the addition of T lymphocytes.  $2 \times 10^5$  isolated T cells /well were cultured in complete RPMI supplemented with 10% FCS. In another experiment, purified T cells were exposed for 30 min with either 10  $\mu\text{M}$  of the MAPK p38 inhibitor SB203580 (Sigma-Aldrich) or DMSO vehicle (Fisher Scientific) and subsequently transferred to tissue culture plates. Cells were stimulated in the presence or absence of  $10^{-7}$  to  $10^{-9}$  M CORT (Sigma-Aldrich). All cultures were performed in triplicates, including the control groups without mitogen. Cells were cultured for 60 hours at 37°C, with 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator, all cultures were pulsed with 1  $\mu\text{Ci}/\text{well}$  of [<sup>3</sup>H]TdR activity specific (GE Healthcare Bio-Sciences; Baie-d'Urfée, Quebec, Canada). Cells were harvested 12 hours later onto glass fiber filter using a Skatron cell harvester (Skatron Instruments, Sterling, VA, USA). Radioactivity was determined with a liquid scintillation counter (LKB Wallac).

#### *Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) labeling*

Cells were resuspended at a concentration of  $10 \times 10^6$  cells/ml in a solution of PBS supplemented with 0.5 % BSA and incubated 10 minutes at 37°C with CFSE at a final working concentration of 5  $\mu\text{M}$  (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). CFSE was subsequently neutralized by adding complete ice-cold RPMI to the cells, followed by a 5 minutes incubation on ice and washed twice with ice-cold RPMI. CFSE-labeled T cells were cultured for 72 hours in 24-well plates with the same conditions as described previously. CFSE labeling efficiency was measured before culture by flow cytometry. Cells were analysed on a FACScan flow cytometer. Histogram analyses were performed using WinMdi software by gating only live cells.

*Cytokine assays*

IL-2 and IFN- $\gamma$  levels in culture supernatants were assayed by sandwich ELISA using paired antibodies. Briefly, Maxisorp 96-well-flat-bottom Nunc immuno-plates (Fisher) were coated with purified rat anti-mouse IL-2 (BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada) or purified rat anti-mouse IFN- $\gamma$  (BD Biosciences) and the assays were performed according to manufacturers indications using respectively biotin rat anti-mouse IL-2 (BD Biosciences) or biotin rat anti-mouse IFN- $\gamma$  (BD Biosciences). The final step of the assays was performed using ABTS substrate (Sigma) and for each well, the optical density at 405nm was determined on a Powerwave X microplate reader (Bio-Tek instruments). The concentrations of IL-2 and IFN- $\gamma$  in the samples were determined by interpolation against a standard curve produced respectively with murine recombinant IL-2 (eBioscience) or IFN- $\gamma$  (eBioscience).

*Western blot*

5x10<sup>5</sup> cells were diluted in sample buffer, subjected to SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, Ca, USA) for anti-GR (sc-1004; Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), for anti-MKP-1 (sc-370; Santa Cruz) and anti-HSP70 and HSP90 (Stressgen Bioreagents, Ann Arbor, MI, USA) blots or PVDF membrane (Bio-Rad, Hercules, Ca, USA) for anti-phospho p38 MAPK (Biosource) and anti-p38MAPK (sc-535; Santa Cruz Biotechnology) blots. The membranes were washed in Tris-buffered saline (TBS; 50 mM Tris , pH 8.0, and 150 mM NaCl) and probed according to manufacturers indication. Specific antibody-antigen complexes were identified using a horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit antibody (sc-2004; Santa

Cruz biotechnology) or anti-mouse antibody (GE Healthcare biosciences) and ECL Western blotting detection reagents (GE Helthcare biosciences). Membranes were stripped and reprobed with antibody against mouse actin (A4700; Sigma-Aldrich) to evaluate protein loading in each sample.

#### *Statistical analysis*

All data are expressed as mean +/-SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA comparison test using the Graphpad InStat 3.05 software program (GraphPad Software, San Diego, Ca). Differences between groups were considered statistically significant when the probability by chance was less than 5 % ( $p < 0.05$ ). All experiments were performed in quadruplicates to confirm our results.

## **RESULTS**

### *GR levels are specifically elevated in T-cells but not in total splenocytes from burn-injured mice*

A small number of studies have evaluated the role of normally secreted-GC following a burn injury on T lymphocytes. Three of them suggested a pro-apoptotic role for GC on thymocytes and mature T cells while Faunce et al. have shown that GC protected burned mice from severe immune dysfunction that occurred on day 1 and 2 post-burn by regulating IL-6 production (1-3; 41). However, these work focused on the early response to trauma injury (24-48h) and on GC-mediated response such as increased apoptosis and decreased IL-6 prodution but not on GR expression. On day 10 post-burn injury, increased cell activation was noted in splenic T lymphocytes. It was previously demonstrated that T cell activation corresponded with increased GR expression (42).

Therefore, we first investigated the expression of GR in total spleen cells and isolated T lymphocytes from sham- and burn-injured mice at day 10 post-burn. While splenocytes from both sham- and burn-injured mice showed similar GR levels (Fig. 1A), GR was highly expressed in isolated splenic T cells from burn-injured mice (Fig. 1B). To verify if other components of the GR were modulated as well by burn injury we also measured the levels of HSP 70 and 90 in isolated T cells. These proteins act as chaperone to GR and are essential for the proper conformation of the inactive GR. Interestingly, while GR levels were strongly increased following burn injury, HSPs levels were similar to control values. This suggests that GR is specifically regulated in isolated T cells at day-10 post burn-injury and a possible role for GCs in T cell-mediated responses following thermal injury.

*Splenic T lymphocytes from burn-injured mice are less sensitive to GC-induced apoptosis.* In order to verify if GR levels in isolated splenic T cells correlated with sensitivity to GC-induced apoptosis, we have exposed lymphocyte to CORT concentrations ranging from  $10^{-6}$  to  $10^{-8}$  M for 24 hours. Apoptosis was subsequently determined by flow cytometry using propidium iodine to evaluate cell-cycle and the % of sub-G0 cells. T lymphocytes from burn-injured mice were significantly less sensitive to GC-induced apoptosis when exposed to  $10^{-6}$  M CORT (Fig. 2). To investigate whether altered gene expression underlies GC-induced apoptosis, we used the pharmacological inhibitor RU-486, which is known to block the agonistic activity of the GR by competitive binding to the ligand-binding domain (43). As expected, RU-486 prevented GC-induced apoptosis in splenic T cells from both sham- and burn-injured mice. These results suggests that T cells from burn-injured mice are more resistant to GC-induced apoptosis.

*Splenic T cells from burn-injured mice are highly proliferative and demonstrate resistance to the antiproliferative effect of GC.*

A previous work from our laboratory has demonstrated that on day-10 post-burn, splenic T cells from burn-injured mice expressed system xC<sup>-</sup> thus being independant to 2-ME supplementation of cell-culture media (D'Elia M et al, submitted manuscript). Moreover, anti-CD3 stimulated T cells from burn-injured mice were found to be highly proliferative in these conditions but their sensitivity to GC was never investigated. Therefore, we stimulated splenic T cells from sham- and burn-injured mice with either 10 (Fig. 3A) or 1  $\mu$ M (Fig. 3B) plate-bound anti-CD3 and exposed the cells to CORT concentration ranging from  $10^{-7}$  to  $10^{-9}$  M. Stimulated T cells were more responsive when stimulated with 10  $\mu$ g/ml than with 1  $\mu$ g/ml plate-bound anti-CD3 and splenic T cells from burn injured mice were significantly more proliferative in all conditions with the exception of control cells that were not stimulated. Previous experiments have reported that  $10^{-7}$  M CORT was sufficient to significantly decrease T cell proliferation from normal animals (44). Interestingly, T-cells from burn-injured mice are totally resistant to CORT anti-proliferative effects.

*GC-resistant T cells from burn-injured mice display greater cell division, less activation-induced cell death and high levels of CD25*

Based on the in vitro proliferation studies, splenic T cells from burn-injured mice proliferate more and exhibit resistance to GC. To confirm these findings, we labeled cells with CFSE and evaluated the cell division profile by flow cytometry (Fig. 4A). Non-stimulated cells were positive for CFSE staining but no cell division peaks were noticeable. In contrast, anti-CD3 stimulated cells showed several peaks as fluorescence

was divided by each cell division. Splenic T cells from both sham- and burn-injured mice responded to anti-CD3 stimulation (M1 marker on the histograms). However, cells that were highly proliferative represented on the histograms by M4 and M5 markers were found largely in burn-injured animals (19 % for burn-injured mice vs 8% for control animals). Moreover, the exposition of stimulated cells to  $10^{-7}$  M CORT greatly inhibited cell division for sham-injured animals, only 2 % of the cells reached M4 and M5 markers while having no effect on the cell division from burn-injured mice, 21 % of the cells were found in markers M4 and M5. We wished to analyze if increased cell division correlated with decreased activation-induced cell death or GC-induced apoptosis. Stimulated T lymphocytes were exposed to  $10^{-7}$  and  $10^{-8}$  M CORT. Apoptosis was subsequently determined. T lymphocytes from burn-injured mice were significantly less sensitive to activation-induced cell death (Fig. 4B). In fact, while 50 % of anti-CD3 stimulated splenic T cells from sham-injured mice exhibited fragmented DNA only 35 % of the cells from burn-injured animals were in the same situation. Cell death was increased for both group when cells were exposed to  $10^{-7}$  M CORT but the difference that existed between stimulated sham- and burn-injured splenic T cells was still present. Finally, T cell activation leads to increased expression of the high affinity chain receptor for IL-2 (IL-2Ra) and GC are known to inhibit IL-2R up-regulation and IL-2 production. We determined the expression of CD25 on anti-CD3 stimulated purified T cells from sham- and burn-injured mice cultured with or without  $10^{-7}$  and  $10^{-8}$  M CORT. We showed that CD25 was highly up-regulated following anti-CD3 stimulation with over 81 % of cells from burn-injured mice but only 64 % of cells from sham-injured animals that expressed this chain (Fig. 4C). CORT treatment decreased CD25 expression in T cells from sham-injured animals but had only a minor effect on burn-injured mice. Together, these results

suggests that splenic T cells from burn-injured mice are highly proliferative, less sensitive than control cells to CORT-induced apoptosis or CORT anti-proliferative effect and resistant to CORT-induced down-regulation of CD25 expression.

*Anti-CD3 stimulated cells from burn-injured mice have decreased GR expression*

Previous studies have reported that T cell activation lead to increased GR expression (42). In our burn-injury model we have noted increased GR expression in fresh isolated splenic T cells from thermally-injured mice. We next wanted to determine further GR up-regulation following anti-CD3/CORT stimulation. GR expression was similar between groups when cells were stimulated with 1 $\mu$ g/ml of anti-CD3 mAbs but were decreased in T cells from burn-injured mice when stimulated with 10 $\mu$ g/ml anti-CD3 (Fig. 5). This result suppose that total GR levels are modulated during T cell stimulation and that down-regulation of GR may be responsible for decreased sensitivity to GC.

*Anti-CD3 stimulated splenic T cells from burn-injured mice express a sustained phosphorylation of p38 MAPK insensitive to GC.*

T cell activation leads to signal transduction through MAPK proteins. It was previously demonstrated that anti-CD3 stimulation could activate p38 MAPK in T cells (18). Moreover, p38 MAPK was also shown to induce GC resistance through phosphorylation of the GR (27). Conversely, GC are able to induce MKP-1 expression, a phosphatase that inactivates p38 MAPK (34). To study p38 MAPK role in splenic T cells from burn-injured mice, we stimulated the cells from sham- and burn-injured mice with 10 $\mu$ g/ml plate-bound anti-CD3, collected them after 3 days of cell culture. To evaluate GC influence on p38 activity, cells were exposed or not to 10<sup>-7</sup> or 10<sup>-8</sup> M CORT. p38 MAPK

expression and phosphorylation status were assayed. Anti-CD3 stimulation induced p38 MAPK phosphorylation in cells from both groups but only T cells from burn-injured mice showed sustained phosphorylation of p38 MAPK when exposed to  $10^{-7}$  M CORT (Fig. 6 A). On the other hand, cells from sham-injured animals were sensitive to GC as phosphorylation levels of p38 MAPK decreased significantly (#  $P < 0.05$ ) following exposition to  $10^{-7}$  M CORT (Fig. 6 B). Finally, MKP-1 is induced in T cells following their activation (Fig. 6 C). However, cells from burn-injured mice failed to further up-regulate MKP-1 expression when exposed to CORT. These results suggest that p38 MAPK is activated in anti-CD3 stimulated T cells and that sustained phosphorylation of p38 MAPK in CORT-treated cells from burn-injured mice contributes to GC resistance.

*Pharmacological inhibition of p38 MAPK normalizes T cell proliferation from burn-injured mice but does not restore CORT sensitivity.*

To confirm a relationship between p38 MAPK phosphorylation, T cell proliferation and CORT sensitivity. p38 MAPK activity was inhibited with  $10\mu\text{M}$  SB203580, a specific p38 MAPK inhibitor. Cells from sham- and burn-injured mice that were treated or not with the inhibitor were stimulated with plate-bound anti-CD3 mAbs and T cell proliferation was determined. T cell proliferation from burn-injured mice was significantly higher than controls and insensitive to CORT anti-proliferative effect while cell proliferation from sham-treated animals was significantly (#,  $P < 0.05$ ) inhibited by  $10^{-7}$  M CORT. T cells from burned mice treated with p38 MAPK inhibitor showed a proliferation response significantly reduced ( \*\*\*,  $P < 0.001$ ). Inhibition of p38 MAPK did not render cells from thermally-injured mice sensitive to GC as proliferation of cells

treated with SB203580 was not reduced when exposed to  $10^{-7}$  M CORT. This result demonstrate that specific inhibition of p38 MAPK, while not restoring sensitivity to GC, significantly reduced proliferation of splenic T cells from burn-injured mice. Cell proliferation was not reduced to control levels and p38 MAPK may partially account for increased proliferation of burn-injured splenic T lymphocytes.

*Pharmacological inhibition of p38 MAPK normalizes IFN- $\gamma$  while increasing IL-2 production in burn-injured mice*

Stimulation of T cells lead to the production of cytokines such as IFN- $\gamma$  and IL-2. IFN- $\gamma$  production in T cells is mainly controlled by signal transduction through p38 MAPK while IL-2 is partially regulated by this kinase (23). T cell proliferation depends on cytokine production as T cells from burn-injured mice are highly proliferative we wanted to investigate if firstly, it was related to increased cytokine production and secondly, if inhibition of p38 MAPK had any influence on INF- $\gamma$  or IL-2 production by T cells from burn-injured mice. In order to address this, cell culture supernatants from the previous experiment were collected and cytokine levels were measured by ELISA. As expected, both INF- $\gamma$  and IL-2 levels were significantly elevated in cells from burn-injured mice this being consistent with increased proliferation. Interestingly, production of both cytokines was reduced significantly (#,  $P < 0.05$ ) when cells from sham- and burn-injured mice were exposed to  $10^{-7}$  M CORT. However, p38 inhibition resulted in a significant reduction of IFN- $\gamma$  production by cells from thermally-injured mice, while significantly increasing IL-2 production in cells that were exposed to  $10^{-7}$  M CORT. These results suggests that T cells from burn-injured mice are mainly Th1 committed as they produce

high levels of IFN- $\gamma$  and that p38 MAPK inhibition normalizes IFN- $\gamma$  production without inhibiting IL-2 production.

## DISCUSSION

The immune suppression is defined as an inability to respond adequately to mitogenic or antigenic challenge either in vivo or in vitro (45). Previous studies by our laboratory have indicated that T cells were highly activated on day-10 post-burn injury and their proliferation in vitro was markedly elevated compared to cells from sham-injured animals when cultivated in a media without any 2-ME supplementation (39); (D'Elia M, Patenaude J et al. Submitted manuscript). The stress response that follows thermal injury influences mature peripheral T lymphocytes and on day-10 post-burn injury T cells that are present in peripheral organs have been exposed to high CORT concentrations. Therefore, their activity has been influenced by GC hormones. Also, it was reported that MAPK proteins were differentially expressed following thermal injury and that p38 MAPK pathway played a role in contributing to the Th1-to-Th2 shift seen in sepsis (25; 46). This study has focused on evaluating in vitro T cell sensitivity to CORT on lymphocytes from burn-injured mice. We hypothesize that increased in vivo T cell activity seen in the spleen of mice on day 10 post-burn injury may lead to GC-resistance and that p38 MAPK could be responsible for this situation.

Our results indicate that freshly isolated splenic T cells from burn-injured mice expressed high GR levels although they were found to be significantly less sensitive to CORT-induced apoptosis. However when stimulated, low GR expression was detected while

cells were still less sensitive to CORT-induced apoptosis. Increased cell division in stimulated T lymphocytes from burn-injured mice correlated with resistance to CORT anti-proliferative effect. Moreover, CD25 up-regulation following T cell stimulation was also resistant to CORT. Also, T cell stimulation was related to p38 MAPK activation and sustained phosphorylation was seen even though cells were exposed to CORT. The latter was only noted in lymphocytes from burn-injured mice. This can be caused by decreased up-regulation of MKP-1 in activated cells exposed to CORT. Failure to up-regulate MKP-1 expression following GC exposition was noted in alveolar macrophages isolated from patients with severe asthma insensitive to corticosteroid treatments (1). Increased T-cell proliferation was related to high IL-2 and IFN- $\gamma$  production in lymphocytes from burn-injured mice although cytokine production was sensitive to CORT. Pretreatment of cells with the specific p38 MAPK inhibitor SB203580 resulted in a marked suppression of T cell proliferation and IFN- $\gamma$  release in lymphocyte from burn-injured mice. Lymphocyte signaling through p38 MAPK pathway plays a role in increased T cell activity observed on day10 post-burn injury. Interestingly, GC-resistance was not related directly to increased p38 MAPK phosphorylation because when inhibited, it did not restore complete GC-sensitivity. Therefore it appears that alterations in the p38 MAPK pathway may account only for a portion of the changes that contribute to increased proliferation and indirectly to GC resistance observed in splenic T cells from burn-injured mice.

p38 MAPK activity was increased following T cell stimulation. In T lymphocytes from burn-injured mice p38 MAPK was resistant to CORT-induced dephosphorylation. In cells from control mice GC counteract p38 MAPK phosphorylation by inducing the MAPK

phosphatase 1 (MKP-1). It was demonstrated that GC increased the expression of MKP-1 in T lymphocytes which in turn inhibited p38 MAPK phosphorylation (47). In our model, p38 MAPK inhibition reduced significantly the proliferation and IFN- $\gamma$  production by splenic T cells from burn-injured mice. IFN- $\gamma$  is a Th1 type cytokine and its expression depends on transcription factor T-bet. GC inhibit its secretion and promote a shift toward Th2 differentiation. Recently, it was demonstrated that the activated GR interacted physically with T-bet which reduced its transcriptional activity on IFN- $\gamma$  promoter (48).

Another possible mechanism to explain the loss of sensitivity to GC seen in activated T cells from burn-injured mice is the increased IL-2 production observed following anti-CD3 stimulation. In our model, we have demonstrated that T cell proliferation correlated with IL-2 levels but also p38 MAPK activity. Interestingly, another study has noted that T cell proliferation in response to IL-2 was dependent partially on p38 MAPK signaling (20). Previous works conducted on T lymphocytes have related a direct effect of IL-2 on GC sensitivity. It was defined that IL-2 inhibited GR nuclear translocation and transcriptional activity through a mechanism involving a direct interaction with STAT5 which led to GC-resistance (28; 49). In our model, inhibition of p38 MAPK, while decreasing IFN- $\gamma$  production, increased IL-2 secretion in activated T cells from burn-injured mice. Increased IL-2 production by T cells in which p38 MAPK was inhibited is documented in some studies (46; 50; 51). A recent work from Kogkopoulos and colleagues (52) have demonstrated that p38 MAPK inhibition led to increased ERK 1/2 activity which in turn augmented IL-2 production in activated CD4 $^{+}$  T cells.

In summary, we have shown that increased T cell activity seen in the spleen of burn-injured mice on day 10 post-trauma was associated with GC resistance. T cell proliferation, CD25 expression and p38 MAPK phosphorylation were found to be completely resistant to CORT-induced suppression while IFN- $\gamma$  and IL-2 production were CORT-sensitive. Inhibition of p38 MAPK led to decreased cell proliferation and normalized IFN- $\gamma$  production but did not restore completely GC-sensitivity. This study is the first to demonstrate that a single event such as a thermal injury can lead to GC-resistance and identifies p38 MAPK as potential target for pharmacological intervention and treatment of inflammatory disease with increased cell proliferation and cytokine production.

**REFERENCES**

1. Nakanishi T, Nishi Y, Sato EF, et al: Thermal injury induces thymocyte apoptosis in the rat. *J Trauma* 1998; 44:143-148
2. Faunce DE , Gregory MS, Kovacs EJ: Glucocorticoids protect against suppression of T cell responses in a murine model of acute ethanol exposure and thermal injury by regulating IL-6. *J Leukoc Biol* 1998; 64: 724-732
3. Fukuzuka K, Edwards CK 3rd, Clare-Salzler M, et al: Glucocorticoid-induced, caspase-dependent organ apoptosis early after burn injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278: R1005-1018
4. D'Elia M, Patenaude J, Hamelin C, et al: Corticosterone binding globulin regulation and thymus changes after thermal injury in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E852-860
5. Bernier J, Jobin N, Emptoz-Bonneton A, et al: Decreased corticosteroid-binding globulin in burn patients: relationship with interleukin-6 and fat in nutritional support. *Crit Care Med* 1998; 26: 452-460
6. Franchimont D: Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1024: 124-137
7. Nijhuis EW, Hinloopen B, van Lier RA, et al: Differential sensitivity of human naive and memory CD4+ T cells for dexamethasone. *Int Immunol* 1995; 7: 591-595
8. Wiegers GJ, Reul JM: Induction of cytokine receptors by glucocorticoids:

- functional and pathological significance. *Trends Pharmacol Sci* 1998; 19: 317-321
9. Wiegers GJ, Stec IE, Klinkert WE, et al: Glucocorticoids regulate TCR-induced elevation of CD4: functional implications. *J Immunol* 2000; 164: 6213-6220
  10. Plancy SL, Litwack G: Glucocorticoid-induced apoptosis in lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 307-312
  11. Randazzo B, Hirschberg T, Hirschberg H: Inhibition of the antigen activated T cell response by methylprednisolone is caused by inhibition of interleukin-2 (IL-2) production. *Int J Immunopharmacol* 1984; 6: 419-423
  12. Snijdewint FG, Kapsenberg ML, Wauben-Penris PJ, et al: Corticosteroids class-dependently inhibit in vitro Th1- and Th2-type cytokine production. *Immunopharmacology* 1995; 29: 93-101
  13. Wong CK, Lam CW, Wu AK, et al: Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 95-103
  14. Romagnani S: Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *Int J Clin Lab Res* 1991; 21: 152-158
  15. Dong C, Davis RJ, Flavell RA: MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 55-72
  16. Rincon M, Pedraza-Alva G: JNK and p38 MAP kinases in CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Rev* 2003; 192: 131-142

17. Chu Y, Solski PA, Khosravi-Far R, et al: The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation. *J Biol Chem* 1996; 271: 6497-6501
18. Da Silva J, Pierrat B, Mary JL, et al: Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes. *J Biol Chem* 1997; 272: 28373-28380
19. Salmon RA, Foltz IN, Young PR, et al: The p38 mitogen-activated protein kinase is activated by ligation of the T or B lymphocyte antigen receptors, Fas or CD40, but suppression of kinase activity does not inhibit apoptosis induced by antigen receptors. *J Immunol* 1997; 159: 5309-5317
20. Crawley JB, Rawlinson L, Lali FV, et al: T cell proliferation in response to interleukins 2 and 7 requires p38MAP kinase activation. *J Biol Chem* 1997; 272: 15023-15027
21. Berenson LS, Yang J, Sleckman BP, et al: Selective requirement of p38alpha MAPK in cytokine-dependent, but not antigen receptor-dependent, Th1 responses. *J Immunol* 2006; 176: 4616-4621
22. Koprak S , Staruch MJ, Dumont FJ: A specific inhibitor of the p38 mitogen activated protein kinase affects differentially the production of various cytokines by activated human T cells: dependence on CD28 signaling and preferential inhibition of IL-10 production. *Cell Immunol* 1999; 192: 87-95

23. Rincon M, Enslen H, Raingeaud J, et al: Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *EMBO J* 1998; 17: 2817-2829
24. Choudhry MA, Ren X, Romero A, et al: Combined alcohol and burn injury differentially regulate P-38 and ERK activation in mesenteric lymph node T cell. *J Surg Res* 2004; 121: 62-68
25. Fazal N, Choudhry MA, Sayeed MM: Inhibition of T cell MAPKs (Erk 1/2, p38) with thermal injury is related to down-regulation of Ca<sup>2+</sup> signaling. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1741: 113-119
26. Li X, Rana SN, Kovacs EJ, et al: Corticosterone suppresses mesenteric lymph node T cells by inhibiting p38/ERK pathway and promotes bacterial translocation after alcohol and burn injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289: R37-44
27. Irusen E , Matthews JG, Takahashi A, et al: p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 649-657
28. Goleva E , Kisich KO, Leung DY: A role for STAT5 in the pathogenesis of IL-2-induced glucocorticoid resistance. *J Immunol* 2002; 169: 5934-5940
29. Wang Z, Frederick J, Garabedian MJ: Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo. *J Biol Chem* 2002; 277: 26573-26580
30. Miller AL, Webb MS, Copik AJ, et al: p38 Mitogen-activated protein kinase

- (MAPK) is a key mediator in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells: correlation between p38 MAPK activation and site-specific phosphorylation of the human glucocorticoid receptor at serine 211. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 1569-1583
31. Rogatsky I, Waase CL, Garabedian MJ: Phosphorylation and inhibition of rat glucocorticoid receptor transcriptional activation by glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). Species-specific differences between human and rat glucocorticoid receptor signaling as revealed through GSK-3 phosphorylation. *J Biol Chem* 1998; 273: 14315-14321
  32. Sousa AR , Lane SJ, Soh C, et al: In vivo resistance to corticosteroids in bronchial asthma is associated with enhanced phosphorylation of JUN N-terminal kinase and failure of prednisolone to inhibit JUN N-terminal kinase phosphorylation. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 565-574
  33. Szatmary Z, Garabedian MJ, Vilcek J et al: Inhibition of glucocorticoid receptor-mediated transcriptional activation by p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase. *J Biol Chem* 2004; 279: 43708-43715
  34. Lasa M, Abraham SM, Boucheron C, et al: Dexamethasone causes sustained expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 and phosphatase-mediated inhibition of MAPK p38. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 7802-7811
  35. Clark AR: MAP kinase phosphatase 1: a novel mediator of biological effects of glucocorticoids? *J Endocrinol* 2003; 178: 5-12
  36. Kassel O , Sancono A, Kratzschmar J, et al: Glucocorticoids inhibit MAP kinase via

- increased expression and decreased degradation of MKP-1. *EMBO J* 2001; 20: 7108-7116
37. Chen P, Li J, Barnes J, et al: Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Immunol* 2002; 169: 6408-6416
  38. Toh ML, Yang Y, Leech M, et al: Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1, a negative regulator of the mitogen-activated protein kinases, in rheumatoid arthritis: up-regulation by interleukin-1 $\beta$  and glucocorticoids. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3118-3128
  39. Patenaude J, D'Elia M, Hamelin C, et al: Burn injury induces a change in T cell homeostasis affecting preferentially CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 141-150
  40. D'Elia M, Patenaude J, Bernier J. Regulation of glucocorticoid sensitivity in thymocytes from burn-injured mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: E97-E104
  41. Fukuzuka K, Edwards CK 3rd, Clare-Salzer M, et al: Glucocorticoid and Fas ligand induced mucosal lymphocyte apoptosis after burn injury. *J Trauma* 2000; 49: 710-716
  42. Lacroix A, Bonnard GD, Lippman ME: Modulation of glucocorticoid receptors by mitogenic stimuli, glucocorticoids and retinoids in normal human cultured T cells. *J Steroid Biochem* 1984; 21: 73-80
  43. Jung-Testas I, Baulieu EE: Inhibition of glucocorticosteroid action in cultured L-

- 929 mouse fibroblasts by RU 486, a new anti-glucocorticosteroid of high affinity for the glucocorticosteroid receptor. *Exp Cell Res* 1983; 147: 177-182
44. Sandi C, Cambronero JC, Borrell J, et al: Mutually antagonistic effects of corticosterone and prolactin on rat lymphocyte proliferation. *Neuroendocrinology* 1992; 56: 574-581
45. Zedler S , Bone RC, Baue AE, et al: T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns. *Crit Care Med* 1999; 27: 66-72
46. Song GY, Chung CS, Chaudry IH, et al: Immune suppression in polymicrobial sepsis: differential regulation of Th1 and Th2 responses by p38 MAPK. *J Surg Res* 2000; 91: 141-146
47. Li LB, Leung DY, Hall CF, et al: Divergent expression and function of glucocorticoid receptor beta in human monocytes and T cells. *J Leukoc Biol* 2006;79: 818-827
48. Liberman AC, Refojo D, Druker J, et al: The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction. *FASEB J* 2007; 21: 1177-1188
49. Biola A, Lefebvre P, Perrin-Wolff M, et al: Interleukin-2 inhibits glucocorticoid receptor transcriptional activity through a mechanism involving STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) but not AP-1. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 1062-1076
50. Veiopoulou C, Kogopoulou O, Tzakos E, et al: IL-2 and IL-10 production by

human CD4+T cells is differentially regulated by p38: mode of stimulation-dependent regulation of IL-2. *Neuroimmunomodulation* 2004; 11: 199-208

51. Song GY, Chung CS, Chaudry IH, et al: MAPK p38 antagonism as a novel method of inhibiting lymphoid immune suppression in polymicrobial sepsis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281: C662-669
52. Kogkopoulos O, Tzakos E, Mavrothalassitis G, et al: Conditional up-regulation of IL-2 production by p38 MAPK inactivation is mediated by increased Erk 1/2 activity. *J Leukoc Biol* 79 2006;1052-1060

## LEGEND OF FIGURES

**Figure 1.** Effect of burn injury on GR expression in splenocytes and isolated splenic T cells at day-10 post-burn.  $5 \times 10^6$  cells (*A*, splenocytes or *B*, splenic T cells) were isolated from sham and burn-injured mice at day-10 post-burn injury, protein were extracted in sample buffer and GR and HSPs protein levels were analysed by Western blot. For GR analysis in splenocytes, each lane represent cells extracted from one mice and results are also presented as grouped values. As for splenocytes, each lane represents an individual and for isolated T lymphocytes, each lane represents grouped individuals. Results are also shown as a burn versus sham ratio. One representative of four independent experiments is shown.

**Figure 2.** Isolated T cells from the spleen of burn-injured mice are less sensitive to CORT-induced apoptosis at day 10 post-burn injury.  $1 \times 10^6$  isolated T cells from sham and burn-injured mice were exposed to CORT ( $10^{-6}$  to  $10^{-8}$  M) in cell media culture for 24h. Cells were also treated with  $10^{-6}$  M CORT in the presence or absence of  $10^{-7}$  M RU-486, 30 minutes prior to CORT exposition to specifically inhibit GC-induced apoptosis. Cell apoptosis was evaluated by flow cytometry as the percent DNA content of sub-G<sub>0</sub>. Data represent mean values of pooled T cells +/- SEM ( $n = 8$  mice per group; \*,  $p < 0,05$ ). Data are representative of four independent experiments.

**Figure 3.** Stimulated splenic T cells from burn-injured mice are resistant to CORT anti-proliferative effect. Splenic T cells from sham- and burn-injured mice were isolated at day 10 post-burn injury. Cells were cultured ( $2 \times 10^5$  cells/well in 96-well plates) and

stimulated with plate-bound anti-CD3 (*A*, 10 $\mu$ g/ml or *B*, 1 $\mu$ g/ml) for 60 hours.  $^3$ H-thymidine was added for the last 12h of cell culture. Data represent mean values of CPM +/- SEM ( $n = 8$  mice per group; #,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ). Data are representative of four independent experiments.

**Figure 4.** Anti-CD3 stimulated splenic T cells from burn-injured mice are less sensitive to CORT suppressive effect as shown by increased cell division cycle, lower apoptotic cell death and increased CD25 expression. Splenic T cells from sham- and burn-injured mice were isolated at day 10 post-burn injury. Cells were labelled with 5  $\mu$ M CFSE, plated ( $2 \times 10^6$  cells/well in 24-well plates) and stimulated with plate-bound anti-CD3 (10 $\mu$ g/ml) for 72 hours. Cells were exposed to CORT ( $10^{-7}$  and  $10^{-8}$ M) or left untreated. Cells were analysed by flow cytometry and histograms were generated (A). M1 marker represents total cell division and M2 to M5 regions represent corresponding cell division peak. One representative out of four independent experiments is shown. Apoptosis was evaluated by flow cytometry as the percent of DNA content sub-G<sub>0</sub> (B). Data represent mean values of pooled T cells +/- SEM ( $n = 8$  mice per group; \*,  $p < 0,05$ ) and are representative of four independent experiments. CD25 expression was evaluated by flow cytometry on gated CD4<sup>+</sup> T cells (C). One representative out of four independent experiments is shown.

**Figure 5.** Splenic T cells from burn-injured mice at day 10 post-burn injury express lower levels of GR protein following anti-CD3 stimulation. Isolated T cells from sham- and burn-injured mice were plated ( $2 \times 10^6$  cells/well in 24-well plates) and stimulated

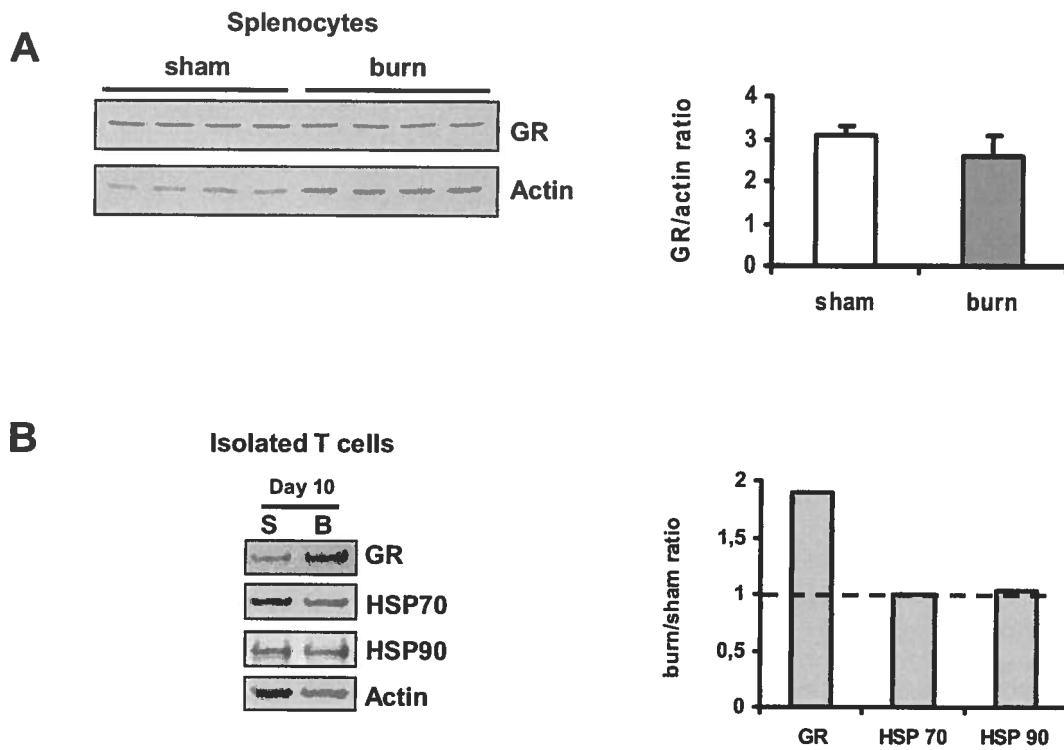
with anti-CD3 (1 or 10 $\mu$ g/ml) for 72 hours. GR levels were evaluated by Western blotting. Each lane represents grouped individuals and results are also expressed as a burn versus sham ratio..

**Figure 6.** GC-resistant splenic T cells from burn-injured mice show sustained expression of p38 MAPK following anti-CD3 stimulation. Isolated T cells from sham- and burn-injured mice were plated ( $2 \times 10^6$  cells/well in 24-well plates) and stimulated with 10 $\mu$ g/ml plate-bound anti-CD3 for 72 hours. Cells were left untreated or exposed to CORT ( $10^{-7}$  and  $10^{-8}$ M). Phosphorylated and non-phosphorylated forms for p38 MAPK were evaluated by Western blotting (*A*) with each lane representing grouped individuals from sham- and burn-injured mice ( $n = 8$  mice per group) and one out of four independent experiment is shown. Results are also expressed as a phospho-p38 versus p38 ratio (*B*) and data represents mean values of four independent experiments +/- SEM (#,  $p < 0,05$ ; \*,  $p < 0,05$ ). One representative blot for MKP-1 expression in T cells is showed (*C*).

**Figure 7.** p38 MAPK inhibition decreases T cell proliferation form burn-injured mice. Splenic T cells from sham- and burn-injured mice were purified at day 10 post-burn injury. Cells were cultured ( $2 \times 10^5$  cells/well in 96-well plates), left untreated or exposed to p38 specific inhibitor SB203580 ( $10^{-7}$ M) for 30 minutes before stimulation with 10 $\mu$ g/ml plate-bound anti-CD3 for 60 hours, left untreated or exposed to CORT ( $10^{-7}$  and  $10^{-8}$ M).  $^3$ H-thymidine was added for the last 12h of cell culture. Proliferative responses are shown as counts per minute. Data represent mean values of CPM +/- SEM ( $n = 8$  mice

per group; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ). Data are representative of four independent experiments.

**Figure 8.** Anti-CD3 stimulated splenic T-cells from burn-injured mice produce more IFN- $\gamma$  (A) and IL-2 (B) and are less sensitive to GC inhibitory effect than control mice. Treatment of burn-injured T cells p38 MAPK inhibitor decreased IFN- $\gamma$  but not IL-2 production to control levels. T cells from sham- and burn-injured mice were harvested at day 10 post-burn injury. Cells were cultured ( $2 \times 10^5$  cells/well in 96-well plates), left untreated or exposed to p38 specific inhibitor SB203580 ( $10^{-7}$ M) for 30 minutes. Cells were stimulated with  $10\mu\text{g/ml}$  plate-bound anti-CD3 for 72 hours, left untreated or exposed to CORT ( $10^{-7}$  and  $10^{-8}$ M). Cell culture supernatants were collected and cytokines were quantified. Data represent mean values ( $n = 8$  mice per group; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ) and (#,  $p < 0,05$ ; different from anti-CD3 stimulated cells for the same group). Data are representative of four independent experiments with three replicates each.

**Figure 1**

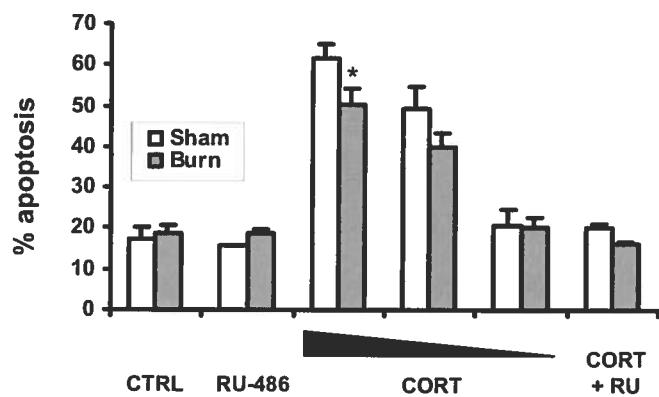


Figure 2

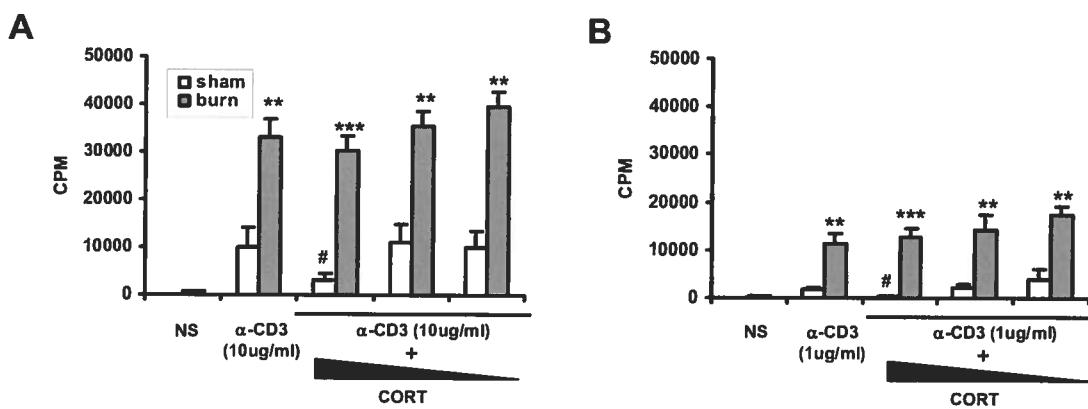


Figure 3

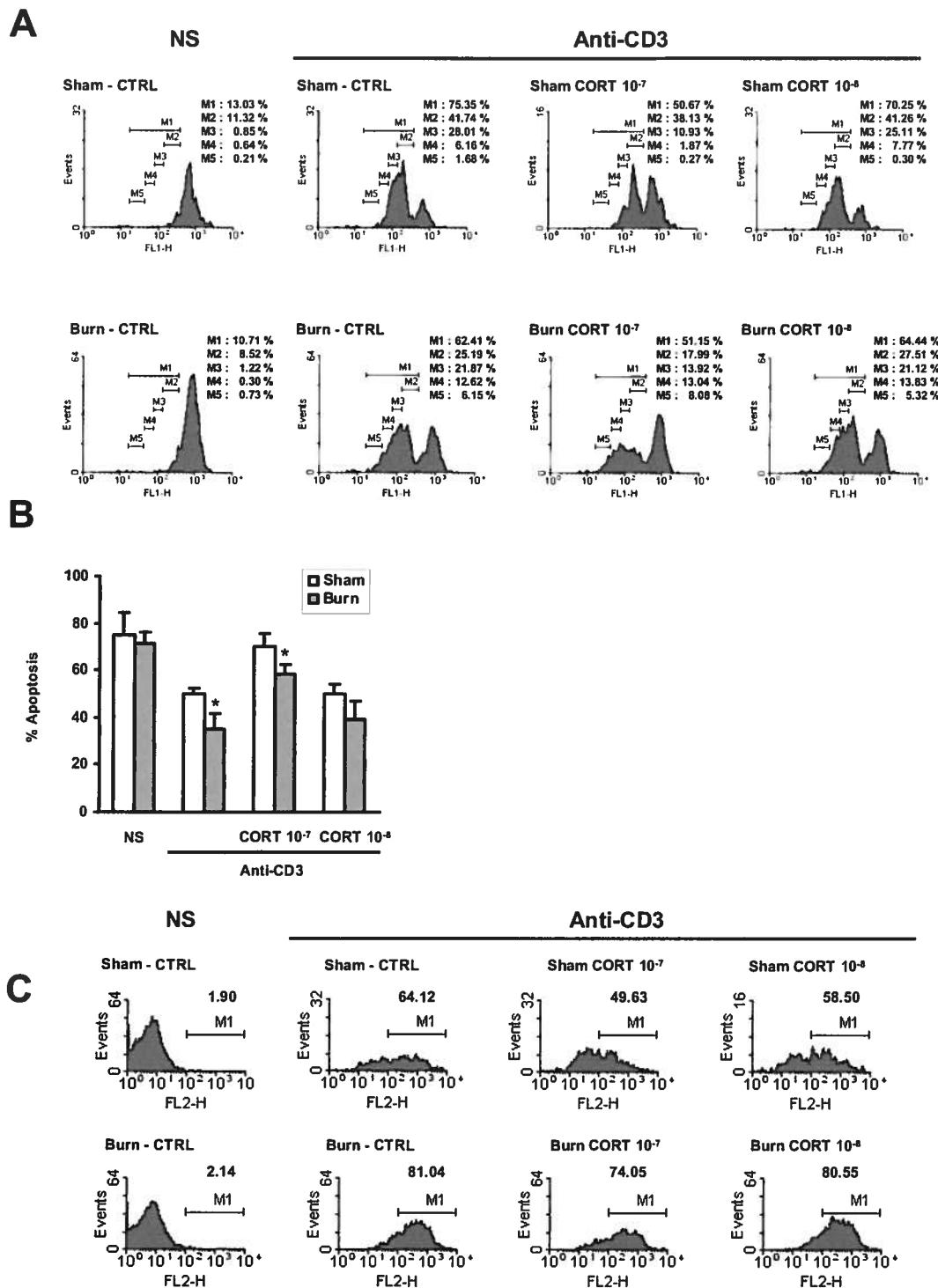
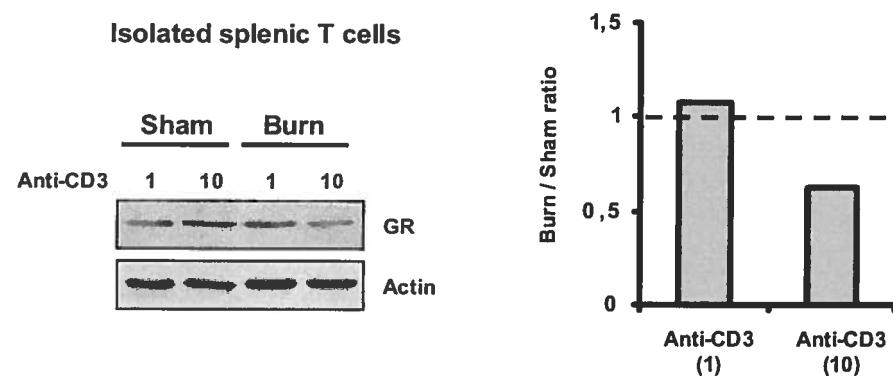
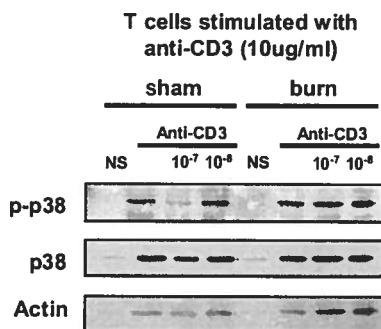
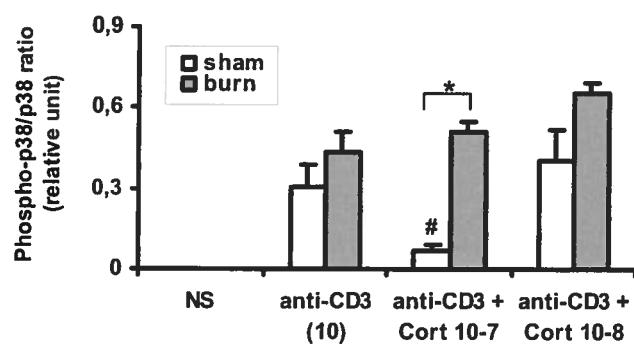
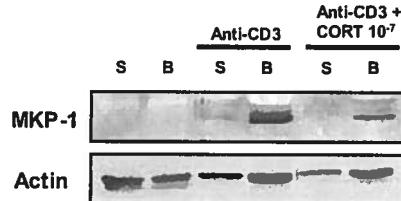


Figure 4



**Figure 5**

**A****B****C****Figure 6**

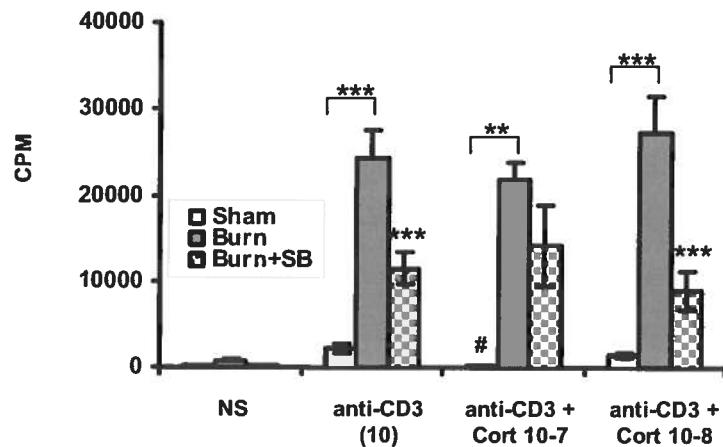
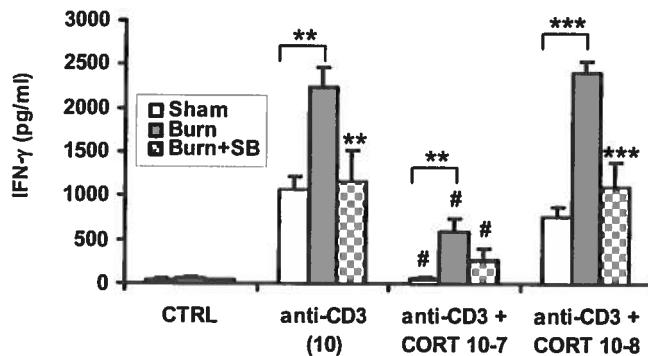
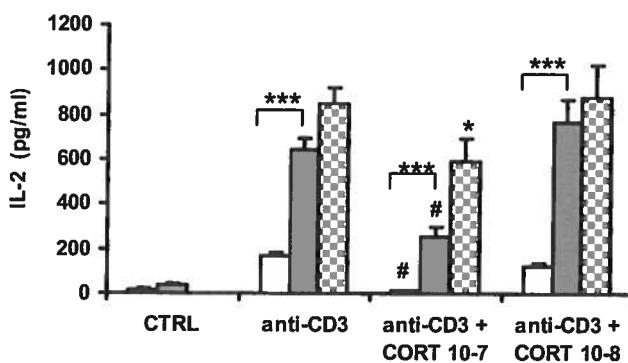


Figure 7

**A****B****Figure 8**

## Chapitre 6 : Discussion et conclusion

---

La réponse de l'organisme au stress nécessite l'action de différents systèmes biologiques tels que les systèmes endocrinien et immunitaire. Chez les grands brûlés, cette réponse est caractérisée par l'augmentation soudaine de l'activité du système nerveux sympathique et de l'axe HPA menant respectivement à la production de catécholamines et de GC, des hormones de stress. Cette adaptation évolutive permet à l'organisme de survivre au traumatisme en initiant la cascade d'événements menant à une réponse hypermétabolique, de favoriser le catabolisme des graisses et des protéines et de contrôler la réponse inflammatoire. Des niveaux de catécholamines et de Cort urinaire plus élevés que la normale furent mesurés chez des patients brûlés jusqu'à 100 jours post-trauma {Norbury, Herndon, et al. 2008}. De plus, une relation existe entre la hausse des niveaux de Cort et la sévérité du traumatisme {Woolf 1992}. Une réponse au stress excessive ou prolongée entraîne divers effets indésirables tels : la perte de masse musculaire, une augmentation de la dépense énergétique et une immunosuppression. Le système immunitaire est sensible à l'action des hormones de stress. Tandis que les catécholamines exercent leur influence via l'innervation des organes du système immunitaire et la présence de récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$ -adrénergiques sur les effecteurs de l'immunité, les GC relâchés au niveau systémique modifient l'action des cellules du système immunitaire via l'expression du GR chez celles-ci {Molina 2005}. Les connaissances actuelles sur le rôle immunomodulateur des catécholamines et des GC suggèrent une activité similaire et immunosuppressive à forte dose. Par exemple, au niveau du thymus, une relation négative fut observée entre la densité de l'innervation et la cellularité de l'organe, ce qui démontre un rôle inhibiteur des catécholamines dans la thymopoïèse {Leposavic, Perisic 2008}.

Plusieurs études ont fait état du lien existant entre la dysfonction des lymphocytes T chez les grands-brûlés et l'incidence de mortalité. Certaines s'intéressent à la régulation qu'exercent les GC sur les thymocytes et lymphocytes T dans les premières 72 heures suivant la brûlure, d'autres vérifiant les fonctions des cellules T après le 7<sup>e</sup> jour post-trauma. Toutefois, aucune n'a réussi à faire le lien entre les effets précoce des GC sur les thymocytes et ce qui survient plus tard au niveau des lymphocytes T matures

périphériques. Des travaux provenant de différentes équipes de recherche, dont la nôtre, ont démontré que l'atrophie thymique observée au jour-1 post-brûlure est directement relié d'une part, à la production massive de GC libérés en réponse au traumatisme et d'autre part, à la chute des niveaux de trans cortine (CBG) qui augmente la quantité Cort libre, biologiquement actif {D'Elia, Patenaude, et al. 2005}; {Nakanishi, Nishi, et al. 1998}; {Fukuzuka, Edwards, et al. 2000}.

Le premier article contenu dans cette thèse cherche à définir la manière dont les GC entraînent l'atrophie du thymus, une conséquence observée dans divers modèles de brûlure sévère. Jusqu'à présent, un consensus définit que la sensibilité des thymocytes aux GC est contrôlée par la production systémique de Cort et les niveaux de l'hormone à l'état libre dans la circulation sanguine. Dans celui-ci, nous démontrons que la sensibilité des thymocytes aux GC est contrôlée au niveau intracellulaire par deux nouveaux facteurs. D'une part, via une augmentation du GR et d'autre part, via la re-génération de GC actifs par l'enzyme 11 $\beta$ -HSD1 exprimée par les thymocytes. Cette première observation s'appuie sur le fait qu'une augmentation systémique de la production d'hormones de stress entraîne une hausse de l'expression du GR dans divers tissus {Spencer, Miller, et al. 1993}. De plus, un lien fut montré entre l'augmentation de l'expression du GR chez les thymocytes et leur apoptose {Pazirandeh, Xue, et al. 2002}. L'expression de la 11 $\beta$ -HSD1 au niveau des thymocytes suggère une transformation des métabolites 11-céto tels la cortisone et le 11-DHC, qui sont biologiquement inactifs, en cortisol/corticostérone, biologiquement actifs, et une augmentation de leurs effets sur ces cellules. Plusieurs études avaient déjà observé la présence des enzymes stéroïdogéniques au niveau du thymus, plus précisément au sein des cellules épithéliales permettant une synthèse de GC actifs à même l'organe {Vacchio, Papadopoulos, et al. 1994}. Cette production locale de Cort par les TEC est suffisante pour entraîner l'apoptose de thymocytes DP CD4 $^{+}$  CD8 $^{+}$  selon un mécanisme impliquant le GR {Zilberman, Zafrir, et al. 2004}. Toutefois, dans un modèle de souris surrénalectomisée, les auteurs ont observé que la production locale de GC dans le thymus ne restaure pas l'homéostasie de l'organe. Ainsi, seuls les GC produits par les glandes surrénales exercent un contrôle sur l'apoptose des thymocytes {Pruett & Padgett 2004}. De plus, l'expression des enzymes

stéroïdogéniques dans le thymus ne permet qu'une très faible synthèse de GC actifs représentant 1 :100000<sup>e</sup> de la production des glandes surrénales. Une concentration aussi minime n'est pas suffisante pour exercer une signalisation via le GR {Pruett & Padgett 2004}. Dans notre modèle de brûlure sévère, nous confirmons la présence de la 11 $\beta$ -HSD1 au niveau des TEC, sans toutefois observer un changement de son expression. Toutefois, nous montrons que l'enzyme est présente directement chez les thymocytes et surtout nous observons une augmentation de son mRNA au jour 1 post-brûlure ce qui suggère un rôle dynamique de la 11 $\beta$ -HSD1 dans l'apoptose massive des thymocytes à ce moment précis.

La présence de l'enzyme 11 $\beta$ -HSD1 et son activité de régénération de GC actifs chez les thymocytes et lymphocytes T matures avait été démontrée pour la première fois dans l'étude de Zhang et collègues {Zhang, Ding, et al. 2005}. Depuis, une seconde étude a vérifié l'expression de l'enzyme à différents stades de la maturation des thymocytes et a restreint sa présence aux cellules de la jonction cortico-médullaire, soit les thymocytes exprimant la chaîne  $\epsilon$  du CD3 {Nuotio-Antar, Hasty, et al. 2006}. Leur activation *in vitro* à l'aide d'un anti-CD3 augmente l'activité réductase de la 11 $\beta$ -HSD1, ce qui soutient l'hypothèse d'un antagonisme mutuel entre les signaux émis par les GC et le TcR/CD3. Dans notre modèle, nous avons observé que l'activité intrinsèque de la 11 $\beta$ -HSD1 était suffisante pour permettre la conversion du DHC en Cort et ainsi entraîner l'apoptose des thymocytes. L'utilisation d'une lignée cellulaire sensible aux GC et exprimant l'ARNm de l'enzyme nous a permis de confirmer ce qui a été observé sur les thymocytes et de montrer un effet additif entre le Cort généré par la 11 $\beta$ -HSD1 et celui provenant du milieu extracellulaire. La lignée 267S3 (CD4 $^+$ CD8 $^+$ CD3 $^+$ ) a été choisie parmi 8 lignées cellulaires différentes dérivées de thymome murins, car elle présente une bonne sensibilité au Cort tout en exprimant l'ARNm de la 11 $\beta$ -HSD1. Ainsi, lorsque des cellules 267S3 étaient exposées de manière concomitante à une concentration non délétère de Cort (0.01 $\mu$ M) et au DHC (1 $\mu$ M), leur niveau d'apoptose était supérieur à celui observé chez celles traitées seulement au Cort ou au DHC.

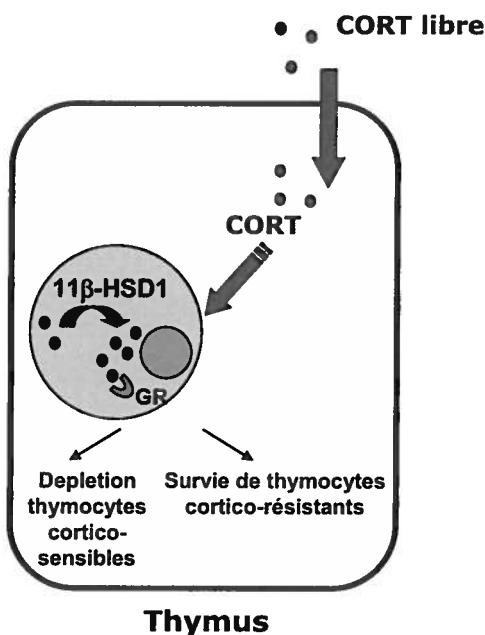
Les cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et dans une moindre mesure l'IL-6, augmentent l'expression et l'activité réductase de la 11 $\beta$ -HSD1. Ceci a été démontré dans divers types cellulaires, mais jamais au niveau du système immunitaire {Chisaka, Johnstone, et al. 2005}; {Tomlinson, Moore, et al. 2001}; {Yong, Harlow, et al. 2002}; {Sun & Myatt 2003}. Parallèlement, les thymocytes possèdent les récepteurs pour ces trois cytokines {Suda, Murray, et al. 1990}. Puisque la brûlure sévère est une situation exceptionnelle causant la libération massive de ces médiateurs de l'inflammation nous voulions vérifier si ce contexte favorable augmentait l'activité réductase de la 11 $\beta$ -HSD1 chez les thymocytes {Drost, Burleson, et al. 1993}; {Finnerty, Herndon, et al. 2006}. L'exposition des thymocytes à l'une ou l'autre de ces cytokines ne modifie pas leur viabilité mais augmente l'effet pro-apoptotique d'un traitement au DHC. Ceci suggère un effet positif des cytokines pro-inflammatoires soit sur l'expression ou l'activité réductase de la 11 $\beta$ -HSD1. Bien qu'une mesure directe de l'activité de synthèse de Cort par l'expression de la 11 $\beta$ -HSD1 chez les thymocytes n'a pas été mesurée, le protocole expérimental actuel nous a permis de vérifier indirectement l'activité de la 11 $\beta$ -HSD1, via l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de l'enzyme et la mesure de l'apoptose directement influencée par la concentration intracellulaire en Cort.

En résumé, une condition comme la brûlure qui entraîne à la fois l'activation de l'axe HPA et une inflammation systémique, permet d'augmenter la sensibilité des thymocytes aux GC via :

- une hausse de la synthèse de GC par les glandes surrénales et de la biodisponibilité du Cort (Cort libre) dans la circulation sanguine {D'Elia, Patenaude, et al. 2005};
- une augmentation de l'expression du GR;
- une augmentation de l'expression de la 11 $\beta$ -HSD1 favorisant une concentration intracellulaire plus importante en GC actifs.

Ces résultats mettent en perspective l'importance de la génération intracellulaire de Cort dans le calcul de la concentration en Cort intracellulaire biologiquement actif. Ainsi, lors de la brûlure sévère, l'augmentation de la production systémique de Cort via l'axe HPA,

la chute des niveaux de transcortine, l'expression de la 11 $\beta$ -HSD1 et l'augmentation du GR au sein des thymocytes sont des facteurs additifs qui rendent les thymocytes plus sensibles aux effets liés à l'hormone. Puisqu'un changement minime de la concentration intracellulaire en Cort peut modifier les fonctions cellulaires, chacun des ces facteurs exerce une influence sur la réponse immunitaire. Malheureusement, l'état actuel des connaissances ne nous permet pas d'établir l'importance singulière de ces facteurs et des expériences supplémentaires sont requises afin de vérifier ceci.



**Figure 21 :** Modèle hypothétique des événements entraînant l'atrophie thymique post-brûlure. Deux sources de GC, l'une systémique et l'autre endogène contrôlent la concentration en Cort dans le thymus. La brûlure sévère provoque une augmentation importante de la production systémique de Cort par stimulation de l'axe HPA. Ceci, combiné à la chute des niveaux du transporteur de l'hormone (CBG) dans la circulation sanguine entraîne une augmentation de sa biodisponibilité pour les tissus cibles. De plus, l'augmentation de l'expression de la 11 $\beta$ -HSD1 chez les thymocytes se traduit par une hausse de la concentration intracellulaire en Cort. L'atrophie thymique serait directement reliée à une augmentation de la concentration intracellulaire en Cort chez les thymocytes causée à la fois par l'importante production systémique, la chute des niveaux de CBG et l'expression de la 11 $\beta$ -HSD1.

La seconde partie de cette étude s'est dirigée au jour 10 post-brûlure où nous avons vérifié les facteurs influençant les lymphocytes T matures de la rate. Des travaux de recherche menés dans notre laboratoire ont montré une augmentation de l'activation et de l'apoptose des lymphocytes T CD4 $^{+}$  de la rate de souris au jour 10 post-brûlure {Patenaude, D'Elia, et al. 2005}. La majorité des études ayant documenté les fonctions

des cellules T au jour 10 post-brûlure ont observé une diminution de la prolifération et de la production d'IL-2, une augmentation de l'apoptose et une anergie. Ces études menées *ex vivo* comparaient les cellules isolées de souris brûlées à celles de souris témoins {Choudhry, Mao, et al. 2002}; {Choudhry, Ren, et al. 2004}; {Schwacha, Ayala, et al. 1999}; {Patenaude, D'Elia, et al. 2005}. La culture cellulaire de lymphocytes T isolés implique l'ajout au milieu de culture de 2-ME, qui a pour but de faciliter l'entrée de cystéine et de permettre la prolifération cellulaire. Cette méthode crée un environnement idéal qui comble les besoins des lymphocytes T en molécules anti-oxydantes {Goodman & Weigle 1977}. Toutefois, dans notre modèle d'étude, le stress oxydatif associé à la brûlure cause, à lui seul, un débancement des fonctions des lymphocytes T {Flescher, Tripoli, et al. 1998}. La dysfonction des lymphocytes T au jour 10 post-brûlure a été reliée à l'hyperactivité des macrophages {Schwacha 2003}. *In vivo*, les CPA peuvent contrôler l'activation et la prolifération des lymphocytes T via la génération de cystéine lors de la présentation antigénique. Ceci suggère qu'un changement dans la production de cystéine par les CPA ou dans les besoins intrinsèques des lymphocytes T pour cet acide aminé pourraient modifier leurs fonctions {Angelini, Gardella, et al. 2002}. Notre premier objectif a donc été de comparer entre souris brûlées et témoins, l'influence du stress oxydatif sur les lymphocytes T isolés au jour 10 post-brûlure. Pour ce faire, nous avons cultivé ces cellules *in vitro* dans un milieu de culture avec et sans 2-ME. Ainsi, il nous a été possible de recréer 2 micro-environnements, à savoir, un réducteur et un oxydatif. Nous avons stimulé les lymphocytes T et par la suite, comparé leur activation et prolifération. Dans environnement oxydatif (sans 2-ME), la cystéine forme des homodimères appelés cystine. Tel que rapporté dans de précédentes études et en lien avec l'immunosuppression documentée au jour 10 post-brûlure, nous avons observé une prolifération moins importante des cellules T isolées de souris brûlées lorsque cultivées *in vitro*, dans un milieu complet (avec 2-ME). Par ailleurs, puisque les lymphocytes T n'expriment pas de système de transport leur permettant d'importer la cystine, nous nous attendions à une très faible prolifération des cellules cultivées dans ce type de milieu et ce, pour les deux groupes {Gmunder, Eck, et al. 1991}. À notre grande surprise, nous avons observé une prolifération importante de cellules T provenant de souris brûlées. Pour la première fois, nous avons démontré la prolifération *in vitro* de lymphocyte T

murins dans un milieu de culture exempt d'une quelconque source de thiols. Pour expliquer cette prolifération, nous avons observé que les lymphocytes T de souris brûlés avaient développé un mécanisme leur permettant de générer ou d'importer des thiols. L'expression du système de transport  $x_c^-$  constitue pour les cellules un moyen d'importer la cystine et de combler leurs besoins en thiols {Bassi, Gasol, et al. 2001}. Or, le stress oxydatif, la cysténurie ainsi que la diminution du pool de GSH sont trois conséquences de la brûlure documentées comme des facteurs augmentant l'expression de xCT, la chaîne légère du système  $x_c^-$  {Bannai 1984}; {Bannai, Sato, et al. 1989}; {Sato, Nomura, et al. 2004}. De plus, une récente étude a observé une augmentation de l'expression de cette protéine dans la rate d'un modèle de septicémie chez la souris {Taguchi, Tamba, et al. 2007}. Nos résultats montrent que les lymphocytes T de souris brûlées expriment la chaîne légère xCT et des niveaux plus élevés de la chaîne lourde CD98. Grâce à l'expression de ces deux chaînes (système  $x_c^-$ ), les lymphocytes T de souris brûlées peuvent transporter activement la  $^{14}\text{C}$ -cystine présente dans le milieu de culture, ce qui mène à leur prolifération dans un milieu de culture exempt en 2-ME.

Nous avons aussi montré que l'inhibition de ce système de transport par la SASP, diminue la prolifération des cellules T de souris brûlées ainsi que leur production d'IL-2. Ceci confirme que l'importation de cystine est, en partie, responsable de cet effet. En effet, la SASP ne diminue pas complètement la prolifération des cellules T, ce qui suggère l'existence d'autres mécanismes, telle la thioredoxine qui permet à ces cellules d'augmenter leur concentration en thiols intracellulaire. La thioredoxine est une enzyme cytosolique ayant un site actif disulfide dont la sécrétion a été observée chez les lymphocytes T activés {Iwata, Hori, et al. 1994}. La présence de thioredoxine favorise le phénotype Th1, et la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-2 {Kang, Jang, et al. 2008}. De plus, une augmentation des niveaux de thioredoxine a été montrée dans le sérum de patients brûlés au jour 7 et 9 post-trauma {Abdiu, Nakamura, et al. 2000}. La thioredoxine libérée par les lymphocytes T activés permet de générer un micro-environnement réducteur autour des cellules, ce qui favorise la présence de thiols, tels que la cystéine, utilisée alors par les cellules T. Notre modèle pourrait expliquer l'état d'activation des lymphocytes T observé *in vivo* dans la rate de souris brûlés.

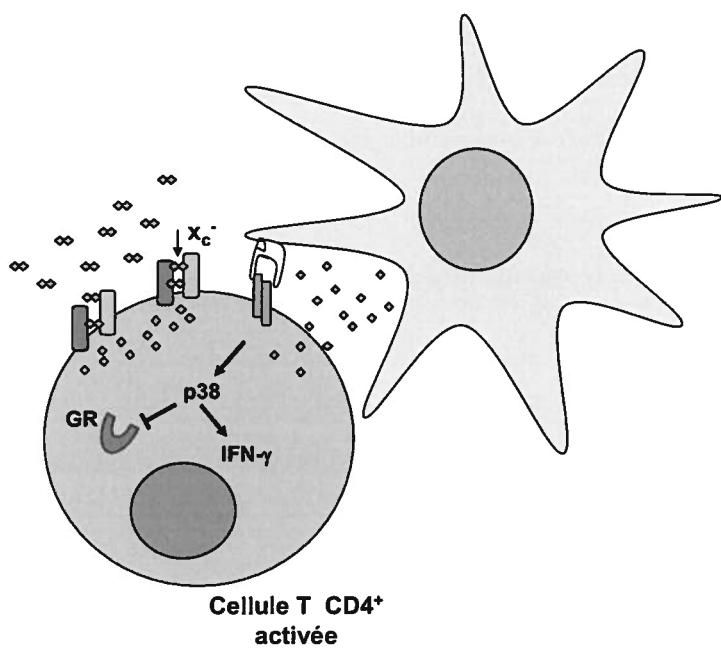
L'activation des lymphocytes T diminue leur sensibilité aux GC. Des études ont montré que la stimulation des cellules via le TCR/CD3 active des voies de signalisation intracellulaire impliquant les protéines MAPKs {Adcock 2000}; {Tsitoura & Rothman 2004}; {Li, Goleva, et al. 2004}. L'expression différentielle de ces protéines a été observée dans des études portant sur la brûlure et parallèlement une boucle d'inhibition mutuelle existe entre les GC et les MAPKs {Alexander, Daniel, et al. 2004}; {Choudhry, Ren, et al. 2004}; {Fazal, Choudhry, et al. 2005}. La réponse au stress qui suit la brûlure sévère influence les lymphocytes T périphériques et il est possible de croire que les cellules présentes dans la rate au jour 10 post-brûlure ont été exposées à de fortes concentrations en Cort. Parallèlement, les radicaux libres produits par la stimulation des cellules T agissent comme messagers secondaires qui activent les voies de signalisation des MAPKs et contrôlent la production d'IL-2 {Tatla, Woodhead, et al. 1999}; {Devadas, Zaritskaya, et al. 2002}. Puisque nous avions montré que les lymphocytes T de souris brûlés s'étaient adaptés au stress oxydatif en exprimant le système  $\alpha_c\beta_2$ , qui favorise leur prolifération, il devenait intéressant de vérifier si l'état d'activation de ces cellules les rendait moins sensibles aux GC. En premier lieu, nous voulions vérifier si l'expression basale du GR et la sensibilité au GC des cellules non stimulées était modifiée par la brûlure sévère. Pour ce faire, nous avons isolé au jour 10 post-brûlure des cellules T de la rate de souris témoins/brûlées et comparé l'expression du GR ainsi que leur viabilité cellulaire post-exposition au Cort. Nos résultats montrent que malgré l'augmentation du GR, les cellules de souris brûlées sont moins sensibles à l'apoptose reliée à leur exposition au GC. Les lymphocytes T de souris brûlées conservent leur résistance aux GC post-stimulation puisqu'une viabilité plus élevée de cellules a été vérifiée lors de leur exposition *in vitro* au Cort. Bien que cette différence soit de l'ordre de 15 % dans les deux cas, il est possible de croire que ces cellules résistantes soient sélectionnées *in vivo* et participent à la réponse immunitaire. Ceci est d'autant plus important dans une situation où le système immunitaire serait sollicité lors d'une infection survenant au-delà du jour 10 post-brûlure et que, chacun de ces clones alors stimulés, se mette à proliférer. Pour vérifier ce fait, nous avons par la suite stimulé et cultivé *in vitro* ces cellules dans les mêmes conditions qui nous ont permis de vérifier leur prolifération dans un milieu

exempt en 2-ME. La baisse de sensibilité au Cort chez ces cellules a été démontrée sur différents paramètres : induction du CD25, division cellulaire, prolifération, activation de la p38 MAPK. Les lymphocytes T provenant de souris témoins montrent une phosphorylation de la p38 MAPK conséquemment à leur stimulation, qui est sensible à l'inhibition par le GC. Tandis qu'une phosphorylation soutenue de cette protéine a été observée chez les cellules T provenant de souris brûlée. Ceci a pour effet d'augmenter la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  par ces cellules et parallèlement d'entraîner une résistance aux GC. L'inhibition mutuelle de la p38 MAPK et des GC a été démontrée. La p38 MAPK inactive les GC via la phosphorylation du récepteur tandis que les GC inactivent la p38 MAPK via l'induction de la protéine phosphatase MKP-1 {Kassel, Sancono, et al. 2001}; {Lasa, Abraham, et al. 2002}. Dans notre modèle, l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de la p38 MAPK (SB203580) a réduit la prolifération des cellules T de souris brûlées et normalisé leur production d'IFN- $\gamma$ . La production de cette cytokine dépend du facteur de transcription T-bet. Les GC diminuent la production d'IFN- $\gamma$  en agissant sur deux paramètres premièrement, en inactivant la p38 MAPK et deuxièmement, via une interaction entre le GR activé et T-bet qui empêche la transcription du gène de l'IFN- $\gamma$  {Liberman, Refojo, et al. 2007}.

Un autre mécanisme pour expliquer la perte de sensibilité aux GC observée chez les lymphocytes T activés de souris brûlées serait relié à leur importante production d'IL-2. Une étude a noté que cette production était partiellement dépendante de l'activité de la p38 MAPK {Veiopoulou, Kogopoulou, et al. 2004}. La signalisation cellulaire via le récepteur à l'IL-2 mène à l'activation du facteur de transcription STAT5. Une résistance aux GC a été observée suite à l'interaction entre STAT5 et le GR, ce qui diminue son transfert dans le noyau {Goleva, Kisich, et al. 2002}.

Dans notre modèle, nous avons observé que l'inhibition pharmacologique de la p38 MAPK diminuait la production d'IFN- $\gamma$  et augmentait parallèlement la production d'IL-2. D'ailleurs, des résultats publiés récemment ont montré que l'inhibition de la p38 MAPK favorisait l'activation de ERK 1/2 ce qui stimulait la production d'IL-2 par les cellules T CD4 $^{+}$  activées {Kogkopoulou, Tzakos, et al. 2006}.

En résumé, nos résultats montrent que l'activité intrinsèque des lymphocytes T de souris au jour 10 post-brûlure est favorisée par l'expression du système  $x_c^-$  et cause une diminution de sensibilité aux GC. La stimulation de ces cellules provoque une forte activité de la p38 MAPK ce qui entraîne une importante production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-2 et favorise leur prolifération. Ceci fut confirmé par des études d'inhibition de la p38 MAPK qui démontrent une normalisation de la prolifération et de la production d'IFN- $\gamma$  ainsi qu'une restauration de la sensibilité aux GC pour ces deux paramètres. Puisque *in vivo*, l'activation des cellules T est dépendante des signaux provenant des CPA, incluant la génération de cystéine, il se peut que l'expression du système  $x_c^-$  par les lymphocytes T diminue leurs besoins. La **Figure 22** qui suit illustre cette hypothèse.



**Figure 22 :** Modèle hypothétique représentant au jour 10 post-brûlure l'augmentation du pool intracellulaire en cystéine qui favorise l'activité des cellules T CD4<sup>+</sup> et leur résistance aux GC. *In vivo*, l'expression du système  $x_c^-$  chez les lymphocytes T permet d'abaisser leur dépendance à la cystéine produite par les CPA et favorise leur activation. Ceci, conjugué à la cystéine libérée dans la jonction immunitaire et à la stimulation du TCR par le complexe CMH-peptide sur les CPA augmente la force des signaux d'activation dans la cellule T et par le fait même, la phosphorylation de la protéine p38 MAPK. Il en résulte une diminution de l'activité transcriptionnelle du GR et l'augmentation de la production d'IFN- $\gamma$ .

## Perspectives

La brûlure sévère est un phénomène complexe impliquant une diversité de médiateurs et d'événements physiologiques. Les résultats présentés dans cette thèse soulèvent certaines questions qui mériteraient qu'on s'y intéresse. Une première qui demeure sans réponse : est-ce que l'atrophie thymique résultant de l'apoptose massive des thymocytes qui survient post-brûlure est une conséquence du traumatisme ou un mécanisme de protection de l'organisme visant à restreindre momentanément le répertoire de lymphocytes T matures ? Au jour 1 post-brûlure, la quantité d'antigènes du soi disponibles dans la circulation sanguine est importante et une modification des signaux d'activation lors de la sélection des thymocytes pourrait induire la maturation de cellules auto-réactives ou T régulatrices. Pour vérifier ce fait, nous pourrions traiter des souris avec du RU-486, un inhibiteur du récepteur à GC, à une concentration qui assure la survie des souris post-brûlure, mais qui empêche l'atrophie thymique. Par la suite, nous pourrions caractériser les cellules T retrouvées en périphérie au jour 10 post-brûlure.

Un autre point d'intérêt serait de vérifier si l'expression de la 11 $\beta$ -HSD1 chez les thymocytes est essentielle à l'induction de l'atrophie thymique observée lors de la brûlure sévère ? Pour ce faire, nous pourrions administrer à des souris du Magnolol, extrait de la plante *Magnolia Officinalis*, qui possède la propriété d'inhiber spécifiquement la 11 $\beta$ -HSD1 exprimée dans le thymus tout en n'influençant pas la concentration périphérique en Cort {Horigome, Homma et al. 2001}. Nous pourrions par la suite vérifier comment la brûlure influence les sous-populations de thymocytes dans ces souris. Idéalement, il serait souhaitable d'induire brûlure sévère à des souris déficientes pour la 11 $\beta$ -HSD1 et d'ainsi vérifier le rôle de la production locale de Cort dans l'atrophie thymique et l'établissement du répertoire de cellules T matures. Malheureusement, une plus grande susceptibilité au choc endotoxique fut montrée chez ces animaux, ce qui laisse supposer un taux de mortalité élevé post-brûlure {Zhang & Daynes 2007}. Finalement, il serait intéressant de vérifier l'importance de la régénération intracellulaire de GC actifs dans la sélection des thymocytes et de comprendre son rôle dans l'établissement d'un répertoire de cellules T matures. Pour démontrer ce fait, nous pourrions utiliser des souris « knockout » pour la

$11\beta$ -HSD1 et montrer l'influence d'une modulation du Cort périphérique (3 concentrations croissantes), via l'implantation de pompe osmotique sous-cutanée, sur les sous-populations thymiques en comparant les résultats obtenus avec des souris témoins exprimant la  $11\beta$ -HSD1. Aussi, nous pourrions caractériser les clones sélectionnés dans chacune des situations en mesurant la diversité du répertoire des chaînes V $\beta$ .

Aussi, quelle est l'origine des lymphocytes T qui, au jour 10, développent une résistance aux GC. Est-ce que ce sont les nouveaux émigrants du thymus sélectionnés en période de concentration élevée de GC dans l'organisme ou plutôt les cellules matures résidantes de la rate au moment de la brûlure et qui furent activées lors du choc initial ? Ces cellules sont-elles issues de clones en prolifération homéostatique, un processus observé dans des situations de lymphopénie permettant le rétablissement temporaire du système immunitaire ? Pour différencier les émigrants du thymus vs les cellules retrouvées en périphérie nous pourrions utiliser un modèle d'irradiation induisant une déplétion du système immunitaire. Nous pourrions injecter à ces souris des splénocytes de souris témoins marquées au CFSE. Après une courte période de récupération permettant au thymus de retrouver une cellularité normale, ces souris seraient soumises à une brûlure sévère. Au jour 10 post-brûlure, nous pourrions caractériser chez ces souris les cellules T de la rate selon leur nature et leur fonction et différencier les clones en prolifération selon leur provenance (thymus (CFSE -) ou résidentes de la rate (CFSE +)).

Finalement, est-ce que la présence du système x<sub>c-</sub> est essentielle à l'établissement d'une perte de sensibilité aux GC ? L'inhibition thérapeutique du système x<sub>c-</sub> permettrait-elle de résoudre la sur-activation des lymphocytes T ou de restaurer leur sensibilité aux GC ? Existe-t-il d'autres mécanismes permettant aux lymphocytes T de s'adapter au stress oxydatif résultant de la brûlure sévère ? Est-ce que l'expression de xCT chez les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de type Th1 est un nouveau marqueur permettant d'associer ces cellules aux pathologies inflammatoires ? Pour répondre à toutes ces questions nous pourrions en premier lieu administrer du NAC à des souris brûlées et vérifier le résultat d'une normalisation des niveaux de cystéine sur l'induction de xCT et la réponse adaptative au jour 10 post-brûlure. En deuxième lieu, nous pourrions reprendre les

expériences présentées dans le troisième article et vérifier la sensibilité au CORT des cellules T activées suite à l'inhibition pharmacologique du système  $x_{c^-}$ .

### Conclusion

Le but de ce travail était en premier lieu, de déterminer les facteurs responsables de l'augmentation de la sensibilité aux GC des thymocytes observée au jour 1 post-brûlure. En deuxième lieu, nous voulions vérifier si l'état d'activation des lymphocytes T splénique au jour 10 post-brûlure modifiait leur sensibilité au Cort.

Nos résultats ont permis de montrer que :

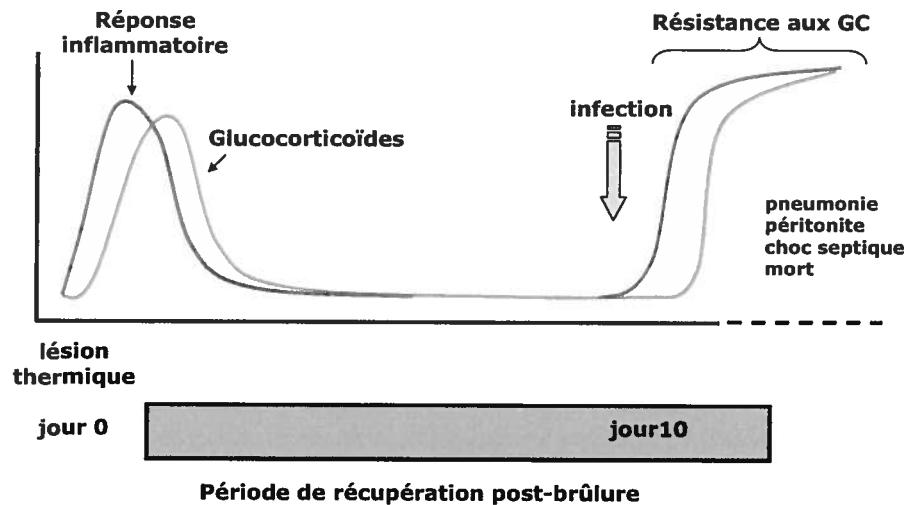
- les cellules épithéliales du thymus et les thymocytes expriment l'enzyme  $11\beta$ -HSD1 ;
- la brûlure sévère augmente l'expression de la  $11\beta$ -HSD1 et du GR spécifiquement au niveau des thymocytes ;
- l'activité de la  $11\beta$ -HSD1 au niveau des thymocytes est augmentée par les cytokines pro-inflammatoires ;
- les lymphocytes T de souris brûlés prolifèrent *in vitro* dans un milieu pauvre en molécules anti-oxydantes (sans 2-ME) ;
- la brûlure sévère induit l'expression de  $xCT$  et augmente l'activité de transport du système  $x_{c^-}$ , ce qui permet l'entrée de cystine et favorise leur prolifération *in vitro*;
- la prolifération des lymphocytes T de souris brûlées ainsi que la production d' $IFN-\gamma$  et d' $IL-2$  est insensible à l'effet inhibiteur des GC;
- la baisse de sensibilité des lymphocytes T de souris brûlés aux GC serait reliée à une forte phosphorylation de la p38 MAPK et à une baisse de l'expression de la protéine phosphatase MKP-1.

Nous pouvons conclure que la brûlure sévère mène à une phase de sensibilité aux GC visible au jour 1 chez les cellules T immatures (thymocytes) et, 10 jours plus tard, à une phase de résistance aux GC chez les lymphocytes T matures. En premier lieu, nos résultats suggèrent que l'apoptose massive des thymocytes en réponse au stress de la

brûlure sévère serait reliée à l'augmentation conjointe de l'activité de la 11 $\beta$ -HSD1 et de l'expression du GR. Ce fait est appuyé par des expériences menées sur des thymocytes de souris témoins et une lignée cellulaire de thymome 267S3 qui démontrent que l'expression de la 11 $\beta$ -HSD1 augmente la conversion intracellulaire du DHC en Cort et l'apoptose de ces cellules. Les cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  favorisent l'activité de conversion du DHC en Cort chez les thymocytes. Ce résultat concorde avec plusieurs études qui en firent la démonstration dans divers types cellulaires. Ceci suggère que la brûlure sévère provoque une augmentation de l'expression et de l'activité de la 11 $\beta$ -HSD1 ainsi que de l'expression du GR chez les thymocytes. Ce facteur, combiné à la hausse des niveaux plasmatiques de Cort entraîne une apoptose massive des thymocytes.

À l'inverse, au jour 10 post-brûlure les lymphocytes T matures développent une résistance aux GC. Cette baisse de sensibilité serait reliée à l'activité intrinsèque de ces cellules, à leurs besoins réduits en thiols et à l'expression de xCT. Tel que définit dans la littérature, un milieu riche en thiols favorise la prolifération des lymphocytes T. *In vivo*, les thiols sont générés dans le milieu extracellulaire par les CPA, ce qui suggère un niveau de contrôle supplémentaire permettant d'assurer un activation adéquate des lymphocytes T. Dans le contexte de la brûlure, plusieurs études ont démontré d'une part, l'hyperactivation des macrophages et d'autre part, un défaut des CPA à activer adéquatement les lymphocytes T. Parallèlement, une diminution des acides aminés et une augmentation des radicaux libres dans la circulation sanguine ont été observés. Ces deux facteurs mènent à l'expression de xCT et à la formation d'un système x<sub>c</sub>- actif à la surface des lymphocytes T leur permettant d'importer directement la cystine. Ce mécanisme constitue une adaptation de ces cellules au stress oxydatif résultant de la brûlure sévère. Nos résultats ont montré que les lymphocytes T de souris brûlées diminuaient leur dépendance aux CPA pour répondre à leurs besoins en thiols. Cela laisse supposer que des cellules qui normalement n'auraient pu s'activer, parviennent maintenant à le faire, et des cellules, qui en temps normal, réussissaient à s'activer adéquatement, meurent par sur-activation (AICD). De plus, ces cellules sont moins sensibles aux GC. Leur prolifération et la production d'IFN- $\gamma$  est réfractaire au contrôle qu'exercent les GC via

un mécanisme impliquant la l'activité de la p38 MAPK. *In vivo*, cela laisse supposer que lorsqu'une infection se déclare chez un patient, l'hyperactivation des cellules T et l'incapacité des GC à contrôler cette réponse sont deux facteurs favorisant le choc inflammatoire systémique. La Figure 23 qui suit montre la relation qui existe entre la réponse inflammatoire et celle reliée aux GC.



**Figure 23 :** Schéma de la réponse inflammatoire et des niveaux de GC dans l'organisme suivant une brûlure sévère. Le choc initial de la brûlure provoque une réponse inflammatoire systémique qui est immédiatement suivie et contrôlée par une réponse anti-inflammatoire reliée à la production massive de GC via la stimulation de l'axe IHPA. Ceci a pour effet de rétablir un équilibre visible au jour 5 post-brûlure. Les complications engendrées par l'état physiologique du patient le rendent vulnérable aux infections. Lorsque cela se produit, l'organisme génère une réponse inflammatoire pour combattre l'infection. Parallèlement, les niveaux de GC augmentent graduellement pour contenir cette réponse inflammatoire. Toutefois, une résistance au GC s'est installée chez les cellules du système immunitaire et celles-ci ne répondent plus ou très peu aux GC. La réponse immunitaire s'emballe, devient non-spécifique et ce choc systémique favorise une dégradation de l'état du patient, augmentant la morbidité et la mortalité.

## **Bibliographie**

---

- ABDIU, A., H. Nakamura, B. Sahaf, J. Yodoi, A. Holmgren et A. Rosen. 2000. "Thioredoxin blood level increases after severe burn injury". Antioxid Redox Signal, vol. 2, p. 707-16.
- ADCOCK, I. M. 2000. "Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions". Pulmonary Pharmacology and Therapeutics, vol. 13, p. 115-26.
- ADCOCK, I. M. et K. Ito. 2005. "Glucocorticoid pathways in chronic obstructive pulmonary disease therapy". Proc Am Thorac Soc, vol. 2, p. 313-9; discussion 340-1.
- AEBERLI, D., Y. Yang, A. Mansell, L. Santos, M. Leech et E. F. Morand. 2006. "Endogenous macrophage migration inhibitory factor modulates glucocorticoid sensitivity in macrophages via effects on MAP kinase phosphatase-1 and p38 MAP kinase". FEBS Letters, vol. 580, p. 974-81.
- AIDOO, A., R. J. Feuers, L. E. Lyn-Cook, M. E. Bishop et D. A. Casciano. 1996. "Characterization of rat lymphocyte primary culture for the development of an in-vitro mutagenesis assay: effect of interleukin-2 and 2-mercaptoethanol on the activities of intermediary metabolism enzymes and cell proliferation". Cell Biology and Toxicology, vol. 12, p. 79-87.
- ALEXANDER, J. W. 1990. "Mechanism of immunologic suppression in burn injury". Journal of Trauma, vol. 30, p. S70-5.
- ALEXANDER, M., T. Daniel, I. H. Chaudry et M. G. Schwacha. 2004. "MAP kinases differentially regulate the expression of macrophage hyperactivity after thermal injury". Journal of Cellular Physiology, vol. 201, p. 35-44.
- ALLFREY, V. G., R. FAULKNER et A. E. MIRSKY. 1964. "ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 51, p. 786-94.
- ALMAWI, W. Y. et O. K. Melemedjian. 2002. "Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor". Journal of Leukocyte Biology, vol. 71, p. 9-15.
- ALMAWI, W. Y., O. K. Melemedjian et M. J. Rieder. 1999. "An alternate mechanism of glucocorticoid anti-proliferative effect: promotion of a Th2 cytokine-secreting profile". Clinical Transplantation, vol. 13, p. 365-74.
- ANGELI, A. 1974. "Circadian ACTH-adrenal rhythm in man". Chronobiologia, vol. 1 Suppl 1, p. 253-70.
- ANGELINI, G., S. Gardella, M. Ardy, M. R. Ciriolo, G. Filomeni, G. Di Trapani, F. Clarke, R. Sitia et A. Rubartelli. 2002. "Antigen-presenting dendritic cells provide the reducing extracellular microenvironment required for T lymphocyte activation". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 99, p. 1491-6.

- ARMUTCU, F., A. Gurcl, M. Hosnute, O. Pabuccu et C. Altnyazar. 2004. "Caffeic acid phenethyl ester improves oxidative erythrocyte damage in a rat model of thermal injury". Journal of Burn Care and Rehabilitation, vol. 25, p. 171-8.
- ARNOLD, H. H. et H. Heinze. 1990. "Treatment of human peripheral lymphocytes with concanavalin A activates expression of glutathione reductase". FEBS Letters, vol. 267, p. 189-92.
- ASENSI, M., J. Sastre, F. V. Pallardo, A. Lloret, M. Lehner, J. Garcia-de-la Asuncion et J. Vina. 1999. "Ratio of reduced to oxidized glutathione as indicator of oxidative stress status and DNA damage". Methods in Enzymology, vol. 299, p. 267-76.
- ASHWELL, J. D., F. W. Lu et M. S. Vacchio. 2000. "Glucocorticoids in T cell development and function\*". Annual Review of Immunology, vol. 18, p. 309-45.
- ASSELIN-LABAT, M. L., A. Biola-Vidamment, S. Kerbrat, M. Lombes, J. Bertoglio et M. Pallardy. 2005. "FoxO3 mediates antagonistic effects of glucocorticoids and interleukin-2 on glucocorticoid-induced leucine zipper expression". Molecular Endocrinology, vol. 19, p. 1752-64.
- ATTUR, M. G., R. Patel, G. Thakker, P. Vyas, D. Levartovsky, P. Patel, S. Naqvi, R. Raza, K. Patel, D. Abramson, G. Bruno, S. B. Abramson et A. R. Amin. 2000. "Differential anti-inflammatory effects of immunosuppressive drugs: cyclosporin, rapamycin and FK-506 on inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, cyclooxygenase-2 and PGE2 production". Inflammation Research, vol. 49, p. 20-6.
- AYROLDI, E., G. Migliorati, S. Bruscoli, C. Marchetti, O. Zollo, L. Cannarile, F. D'Adamio et C. Riccardi. 2001. "Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB". Blood, vol. 98, p. 743-53.
- AYROLDI, E., O. Zollo, A. Bastianelli, C. Marchetti, M. Agostini, R. Di Virgilio et C. Riccardi. 2007. "GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling". Journal of Clinical Investigation, vol. 117, p. 1605-15.
- AYROLDI, E., O. Zollo, A. Macchiarulo, B. Di Marco, C. Marchetti et C. Riccardi. 2002. "Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1". Molecular and Cellular Biology, vol. 22, p. 7929-41.
- BACHER, M., C. N. Metz, T. Calandra, K. Mayer, J. Chesney, M. Lohoff, D. Gemsa, T. Donnelly et R. Bucala. 1996. "An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 93, p. 7849-54.
- BAMBERGER, C. M., A. M. Bamberger, M. de Castro et G. P. Chrousos. 1995. "Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans". Journal of Clinical Investigation, vol. 95, p. 2435-41.

- BANDYOPADHYAY, G., A. De, K. Laudanski, F. Li, C. Lentz, P. Bankey et C. Miller-Graziano. 2007. "Negative signaling contributes to T-cell anergy in trauma patients". Critical Care Medicine, vol. 35, p. 794-801.
- BANJAC, A., T. Perisic, H. Sato, A. Seiler, S. Bannai, N. Weiss, P. Kolle, K. Tschoep, R. D. Issels, P. T. Daniel, M. Conrad et G. W. Bornkamm. 2008. "The cystine/cysteine cycle: a redox cycle regulating susceptibility versus resistance to cell death". Oncogene, vol. 27, p. 1618-28.
- BANNAI, S. 1984. "Induction of cystine and glutamate transport activity in human fibroblasts by diethyl maleate and other electrophilic agents". Journal of Biological Chemistry, vol. 259, p. 2435-40.
- BANNAI, S., H. N. Christensen, J. V. Vadgama, J. C. Ellory, E. Englesberg, G. G. Guidotti, G. C. Gazzola, M. S. Kilberg, A. Lajtha, B. Sacktor et al. 1984. "Amino acid transport systems". Nature, vol. 311, p. 308.
- BANNAI, S. et T. Ishii. 1982. "Transport of cystine and cysteine and cell growth in cultured human diploid fibroblasts: effect of glutamate and homocysteate". Journal of Cellular Physiology, vol. 112, p. 265-72.
- BANNAI, S. et E. Kitamura. 1980. "Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture". Journal of Biological Chemistry, vol. 255, p. 2372-6.
- BANNAI, S., H. Sato, T. Ishii et Y. Sugita. 1989. "Induction of cystine transport activity in human fibroblasts by oxygen". Journal of Biological Chemistry, vol. 264, p. 18480-4.
- BANNAI, S. et N. Tateishi. 1986. "Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals". Journal of Membrane Biology, vol. 89, p. 1-8.
- BARDA-SAAD, M., L. A. Rozenszajn, H. Ashush, Y. Shav-Tal, A. Ben Nun et D. Zipori. 1999. "Adhesion molecules involved in the interactions between early T cells and mesenchymal bone marrow stromal cells". Experimental Hematology, vol. 27, p. 834-44.
- BARLOW, Y. 1994. "T lymphocytes and immunosuppression in the burned patient: a review". Burns, vol. 20, p. 487-90.
- BARNES, P. J. 2006. "Transcription factors in airway diseases". Laboratory Investigation, vol. 86, p. 867-72.
- BARTIS, D., F. Boldizsar, K. Kvell, M. Szabo, L. Palinkas, P. Nemeth, E. Monostori et T. Berki. 2007. "Intermolecular relations between the glucocorticoid receptor, ZAP-70 kinase, and Hsp-90". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 354, p. 253-8.
- BARTIS, D., F. Boldizsar, M. Szabo, L. Palinkas, P. Nemeth et T. Berki. 2006. "Dexamethasone induces rapid tyrosine-phosphorylation of ZAP-70 in Jurkat cells". Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, vol. 98, p. 147-54.

BASSI, M. T., E. Gasol, M. Manzoni, M. Pineda, M. Riboni, R. Martin, A. Zorzano, G. Borsani et M. Palacin. 2001. "Identification and characterisation of human xCT that co-expresses, with 4F2 heavy chain, the amino acid transport activity system xc-". Pflugers Archiv. European Journal of Physiology, vol. 442, p. 286-96.

BAUGH, J. A. et S. C. Donnelly. 2003. "Macrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation". Journal of Endocrinology, vol. 179, p. 15-23.

BAUMANN, S., A. Dostert, N. Novac, A. Bauer, W. Schmid, S. C. Fas, A. Krueger, T. Heinzel, S. Kirchhoff, G. Schutz et P. H. Krammer. 2005. "Glucocorticoids inhibit activation-induced cell death (AICD) via direct DNA-dependent repression of the CD95 ligand gene by a glucocorticoid receptor dimer". Blood, vol. 106, p. 617-25.

BAUS, E., F. Andris, P. M. Dubois, J. Urbain et O. Leo. 1996. "Dexamethasone inhibits the early steps of antigen receptor signaling in activated T lymphocytes". Journal of Immunology, vol. 156, p. 4555-61.

BEISHUIZEN, A., L. G. Thijs et I. Vermes. 2001. "Patterns of corticosteroid-binding globulin and the free cortisol index during septic shock and multitrauma". Intensive Care Medicine, vol. 27, p. 1584-91.

BENGSSON, A., M. Lundberg, J. Avila-Carino, G. Jacobsson, A. Holmgren et A. Scheynius. 2001. "Thiols decrease cytokine levels and down-regulate the expression of CD30 on human allergen-specific T helper (Th) 0 and Th2 cells". Clinical and Experimental Immunology, vol. 123, p. 350-60.

BERKI, T., L. Palinkas, F. Boldizsar et P. Nemeth. 2002. "Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations". International Immunology, vol. 14, p. 463-9.

BERNHAGEN, J., T. Calandra, R. A. Mitchell, S. B. Martin, K. J. Tracey, W. Voelter, K. R. Manogue, A. Cerami et R. Bucala. 1993. "MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia". Nature, vol. 365, p. 756-9.

BERTIN-MAGHIT, M., J. Goudable, E. Dalmas, J. P. Steghens, C. Bouchard, P. Y. Gueugniaud, P. Petit et B. Delafosse. 2000. "Time course of oxidative stress after major burns". Intensive Care Medicine, vol. 26, p. 800-3.

BETTELLI E., M. Oukka et V.K. Kuchroo. 2007. "T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity". Nature Immunology, vol. 8, p. 345-50.

BETHIN, K. E., S. K. Vogt et L. J. Muglia. 2000. "Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 97, p. 9317-22.

BIESALSKI, H. K. et G. P. McGregor. 2007. "Antioxidant therapy in critical care--is the microcirculation the primary target?". Critical Care Medicine, vol. 35, p. S577-83.

BIOLA, A., P. Lefebvre, M. Perrin-Wolff, M. Sturm, J. Bertoglio et M. Pallardy. 2001. "Interleukin-2 inhibits glucocorticoid receptor transcriptional activity through a mechanism involving STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) but not AP-1". Molecular Endocrinology, vol. 15, p. 1062-76.

BLEDSOE, R. K., V. G. Montana, T. B. Stanley, C. J. Delves, C. J. Apolito, D. D. McKee, T. G. Consler, D. J. Parks, E. L. Stewart, T. M. Willson, M. H. Lambert, J. T. Moore, K. H. Pearce et H. E. Xu. 2002. "Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition". Cell, vol. 110, p. 93-105.

BODWELL, J. E., E. Orti, J. M. Coull, D. J. Pappin, L. I. Smith et F. Swift. 1991. "Identification of phosphorylated sites in the mouse glucocorticoid receptor". Journal of Biological Chemistry, vol. 266, p. 7549-55.

BOLDIZSAR, F., L. Palinkas, D. Bartis, P. Nemeth et T. Berki. 2003. "Antigen and glucocorticoid hormone (GC) induce positive selection of DP thymocytes in a TcR transgenic mouse model". Immunology Letters, vol. 90, p. 97-102.

BOMMHARDT, U., M. Beyer, T. Hunig et H. M. Reichardt. 2004. "Molecular and cellular mechanisms of T cell development". Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 61, p. 263-80.

BREWER, J. A., B. P. Sleckman, W. Swat et L. J. Muglia. 2002. "Green fluorescent protein-glucocorticoid receptor knockin mice reveal dynamic receptor modulation during thymocyte development". Journal of Immunology, vol. 169, p. 1309-18.

BRIDGES, C. C., R. Kekuda, H. Wang, P. D. Prasad, P. Mehta, W. Huang, S. B. Smith et V. Ganapathy. 2001. "Structure, function, and regulation of human cystine/glutamate transporter in retinal pigment epithelial cells". Investigative Ophthalmology and Visual Science, vol. 42, p. 47-54.

BROKAW, J. J., G. W. White, P. Baluk, G. P. Anderson, E. Y. Umemoto et D. M. McDonald. 1998. "Glucocorticoid-induced apoptosis of dendritic cells in the rat tracheal mucosa". American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, vol. 19, p. 598-605.

BROOME, J. D. et M. W. Jeng. 1973. "Promotion of replication in lymphoid cells by specific thiols and disulfides in vitro. Effects on mouse lymphoma cells in comparison with splenic lymphocytes". Journal of Experimental Medicine, vol. 138, p. 574-92.

BUCALA, R. 1996. "MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response". FASEB Journal, vol. 10, p. 1607-13.

BURDO, J., R. Dargusch et D. Schubert. 2006. "Distribution of the cystine/glutamate antiporter system xc- in the brain, kidney, and duodenum". Journal of Histochemistry and Cytochemistry, vol. 54, p. 549-57.

CALANDRA, T., J. Bernhagen, C. N. Metz, L. A. Spiegel, M. Bacher, T. Donnelly, A. Cerami et R. Bucala. 1995. "MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production". Nature, vol. 377, p. 68-71.

CALANDRA, T., J. Bernhagen, R. A. Mitchell et R. Bucala. 1994. "The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor". Journal of Experimental Medicine, vol. 179, p. 1895-902.

CALVANO, S. E., J. D. Albert, A. Legaspi, B. C. Organ, K. J. Tracey, S. F. Lowry, G. T. Shires et A. C. Antonacci. 1987. "Comparison of numerical and phenotypic leukocyte changes during constant hydrocortisone infusion in normal humans with those in thermally injured patients". Surgery, Gynecology and Obstetrics, vol. 164, p. 509-20.

CANNARILE, L., F. Fallarino, M. Agostini, S. Cuzzocrea, E. Mazzon, C. Vacca, T. Genovese, G. Migliorati, E. Ayroldi et C. Riccardi. 2006. "Increased GILZ expression in transgenic mice up-regulates Th-2 lymphokines". Blood, vol. 107, p. 1039-47.

CARLETON, M., M. C. Haks, S. A. Smeele, A. Jones, S. M. Belkowski, M. A. Berger, P. Linsley, A. M. Kruisbeek et D. L. Wiest. 2002. "Early growth response transcription factors are required for development of CD4(-)CD8(-) thymocytes to the CD4(+)CD8(+) stage". Journal of Immunology, vol. 168, p. 1649-58.

CETINKALE, O., O. Senel et R. Bulan. 1999. "The effect of antioxidant therapy on cell-mediated immunity following burn injury in an animal model". Burns, vol. 25, p. 113-8.

CHAI, J., Y. Wu et Z. Sheng. 2002. "The relationship between skeletal muscle proteolysis and ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in burned rats". Burns, vol. 28, p. 527-33.

CHAN, E. L. et J. T. Murphy. 2003. "Reactive oxygen species mediate endotoxin-induced human dermal endothelial NF-kappaB activation". Journal of Surgical Research, vol. 111, p. 120-6.

CHAPMAN, K. E., A. Coutinho, M. Gray, J. S. Gilmour, J. S. Savill et J. R. Seckl. 2006. "Local amplification of glucocorticoids by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and its role in the inflammatory response". Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 1088, p. 265-73.

CHEN, C. et J. G. Hirsch. 1972. "The effects of mercaptoethanol and of peritoneal macrophages on the antibody-forming capacity of nonadherent mouse spleen cells in vitro". Journal of Experimental Medicine, vol. 136, p. 604-17.

CHEN, L. W., C. M. Hsu, J. S. Wang, J. S. Chen et S. C. Chen. 1998. "Specific inhibition of iNOS decreases the intestinal mucosal peroxynitrite level and improves the barrier function after thermal injury". Burns, vol. 24, p. 699-705.

CHEN, P., J. Li, J. Barnes, G. C. Kokkonen, J. C. Lee et Y. Liu. 2002. "Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages". Journal of Immunology, vol. 169, p. 6408-16.

CHESNOKOVA, V. et S. Melmed. 2002. "Minireview: Neuro-immuno-endocrine modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by gp130 signaling molecules". Endocrinology, vol. 143, p. 1571-4.

CHISAKA, H., J. F. Johnstone, M. Premyslova, Z. Manduch et J. R. Challis. 2005. "Effect of pro-inflammatory cytokines on expression and activity of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in cultured human term placental trophoblast and human choriocarcinoma JEG-3 cells". Journal of the Society for Gynecologic Investigation, vol. 12, p. 303-9.

CHO, K., L. K. Adamson et D. G. Greenhalgh. 2001. "Parallel self-induction of TNF-alpha and apoptosis in the thymus of mice after burn injury". Journal of Surgical Research, vol. 98, p. 9-15.

CHOUDHRY, M. A., H. Mao, F. Haque, M. Khan, N. Fazal et M. M. Sayeed. 2002. "Role of NFAT and AP-1 in PGE2-mediated T cell suppression in burn injury". Shock, vol. 18, p. 212-6.

CHOUDHRY, M. A., X. Ren, A. Romero, E. J. Kovacs, R. L. Gamelli et M. M. Sayeed. 2004. "Combined alcohol and burn injury differentially regulate P-38 and ERK activation in mesenteric lymph node T cell". Journal of Surgical Research, vol. 121, p. 62-8.

CHRISTENSEN, H. N. et M. E. HENDERSON. 1952. "Comparative uptake of free amino acids by mouse-ascites carcinoma cells and normal tissues". Cancer Research, vol. 12, p. 229-31.

CHRISTENSEN, H. N. et T. R. RIGGS. 1952. "Concentrative uptake of amino acids by the Ehrlich mouse ascites carcinoma cell". Journal of Biological Chemistry, vol. 194, p. 57-68.

CHRISTENSEN, H. N., T. R. RIGGS et N. E. RAY. 1952. "Concentrative uptake of amino acids by erythrocytes in vitro". Journal of Biological Chemistry, vol. 194, p. 41-51.

CHRISTODOULOUPOULOS, P., D. Y. Leung, M. W. Elliott, J. C. Hogg, S. Muro, M. Toda, S. Laberge et Q. A. Hamid. 2000. "Increased number of glucocorticoid receptor-beta-expressing cells in the airways in fatal asthma". Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 106, p. 479-84.

CHUNG, W. J., S. A. Lyons, G. M. Nelson, H. Hamza, C. L. Gladson, G. Y. Gillespie et H. Sontheimer. 2005. "Inhibition of cystine uptake disrupts the growth of primary brain tumors". Journal of Neuroscience, vol. 25, p. 7101-10.

CHURCH, D., S. Elsayed, O. Reid, B. Winston et R. Lindsay. 2006. "Burn wound infections". Clinical Microbiology Reviews, vol. 19, p. 403-34.

COLLINS, S., M. G. Caron et R. J. Lefkowitz. 1988. "Beta-adrenergic receptors in hamster smooth muscle cells are transcriptionally regulated by glucocorticoids". Journal of Biological Chemistry, vol. 263, p. 9067-70.

COOPER, M. S., I. Bujalska, E. Rabbitt, E. A. Walker, R. Bland, M. C. Sheppard, M. Hewison et P. M. Stewart. 2001. "Modulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by proinflammatory cytokines in osteoblasts: an autocrine switch from glucocorticoid inactivation to activation". Journal of Bone and Mineral Research, vol. 16, p. 1037-44.

- CRABTREE, G. R., S. Gillis, K. A. Smith et A. Munck. 1980. "Mechanisms of glucocorticoid-induced immunosuppression: inhibitory effects on expression of Fc receptors and production of T-cell growth factor". Journal of Steroid Biochemistry, vol. 12, p. 445-9.
- CREE, M.G. et R.R. WOLFE. 2007. "Postburn trauma insulin resistance and fat metabolism". American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism, vol. 294, p. E1-9.
- CUZZOCREA, S., E. Mazzon, G. Costantino, I. Serraino, A. De Sarro et A. P. Caputi. 2000. "Effects of n-acetylcysteine in a rat model of ischemia and reperfusion injury". Cardiovascular Research, vol. 47, p. 537-48.
- D'ADAMIO, F., O. Zollo, R. Moraca, E. Ayroldi, S. Bruscoli, A. Bartoli, L. Cannarile, G. Migliorati et C. Riccardi. 1997. "A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death". Immunity, vol. 7, p. 803-12.
- D'ELIA, M., J. Patenaude, C. Hamelin, D. R. Garrel et J. Bernier. 2005. "Corticosterone binding globulin regulation and thymus changes after thermal injury in mice". American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism, vol. 288, p. E852-60.
- DANIEL, T., M. Alexander, W. J. Hubbard, I. H. Chaudry, M. A. Choudhry et M. G. Schwacha. 2006. "Nitric oxide contributes to the development of a post-injury Th2 T-cell phenotype and immune dysfunction". Journal of Cellular Physiology, vol. 208, p. 418-27.
- DARGEMONT, C., D. Dunon, M. A. Deugnier, M. Denoyelle, J. M. Girault, F. Lederer, K. H. Le, F. Godeau, J. P. Thiery et B. A. Imhof. 1989. "Thymotaxin, a chemotactic protein, is identical to beta 2-microglobulin". Science, vol. 246, p. 803-6.
- DAUN, J. M. et J. G. Cannon. 2000. "Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic IkappaBalph". Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, vol. 279, p. R1043-9.
- DAVIES, K. J. 1995. "Oxidative stress: the paradox of aerobic life". Biochemical Society Symposia, vol. 61, p. 1-31.
- DEAK, T., K. T. Nguyen, C. S. Cotter, M. Fleshner, L. R. Watkins, S. F. Maier et R. L. Spencer. 1999. "Long-term changes in mineralocorticoid and glucocorticoid receptor occupancy following exposure to an acute stressor". Brain Research, vol. 847, p. 211-20.
- DEITCH, E. A. 1990. "Intestinal permeability is increased in burn patients shortly after injury". Surgery, vol. 107, p. 411-6.
- DEVADAS, S., L. Zaritskaya, S. G. Rhee, L. Oberley et M. S. Williams. 2002. "Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression". Journal of Experimental Medicine, vol. 195, p. 59-70.

- DEVES, R. et C. A. Boyd. 2000. "Surface antigen CD98(4F2): not a single membrane protein, but a family of proteins with multiple functions". Journal of Membrane Biology, vol. 173, p. 165-77.
- DI BLASIO, A. M., R. Voutilainen, R. B. Jaffe et W. L. Miller. 1987. "Hormonal regulation of messenger ribonucleic acids for P450scc (cholesterol side-chain cleavage enzyme) and P450c17 (17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase) in cultured human fetal adrenal cells". Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 65, p. 170-5.
- DIAZ, L. A. Jr, A. W. Friedman, X. He, R. D. Kuick, S. M. Hanash et D. A. Fox. 1997. "Monocyte-dependent regulation of T lymphocyte activation through CD98". International Immunology, vol. 9, p. 1221-31.
- DICKINSON, D. A. et H. J. Forman. 2002. "Cellular glutathione and thiols metabolism". Biochemical Pharmacology, vol. 64, p. 1019-26.
- DING, H. Q., B. J. Zhou, L. Liu et S. Cheng. 2002. "Oxidative stress and metallothionein expression in the liver of rats with severe thermal injury". Burns, vol. 28, p. 215-21.
- DOBASHI, K., M. Aihara, T. Araki, Y. Shimizu, M. Utsugi, K. Iizuka, Y. Murata, J. Hamuro, T. Nakazawa et M. Mori. 2001. "Regulation of LPS induced IL-12 production by IFN-gamma and IL-4 through intracellular glutathione status in human alveolar macrophages". Clinical and Experimental Immunology, vol. 124, p. 290-6.
- DOMINGUEZ-GERPE, L. et M. Rey-Mendez. 1997. "Time-course of the murine lymphoid tissue involution during and following stressor exposure". Life Sciences, vol. 61, p. 1019-27.
- DONG, C., R. J. Davis et R. A. Flavell. 2002. "MAP kinases in the immune response". Annual Review of Immunology, vol. 20, p. 55-72.
- DORSHKIND, K. et N. D. Horseman. 2001. "Anterior pituitary hormones, stress, and immune system homeostasis". Bioessays, vol. 23, p. 288-94.
- DOXSEE, D. W., P. W. Gout, T. Kurita, M. Lo, A. R. Buckley, Y. Wang, H. Xue, C. M. Karp, J. C. Cutz, G. R. Cunha et Y. Z. Wang. 2007. "Sulfasalazine-induced cystine starvation: potential use for prostate cancer therapy". Prostate, vol. 67, p. 162-71.
- DRAPER, N. et P. M. Stewart. 2005. "11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action". Journal of Endocrinology, vol. 186, p. 251-71.
- DROGE, W., H. P. Eck, H. Gmunder et S. Mihm. 1991. "Modulation of lymphocyte functions and immune responses by cysteine and cysteine derivatives". American Journal of Medicine, vol. 91, p. 140S-144S.
- DROGE, W., S. Mihm, M. Bockstette et S. Roth. 1994. "Effect of reactive oxygen intermediates and antioxidants on proliferation and function of T lymphocytes". Methods in Enzymology, vol. 234, p. 135-51.

DROGE, W., C. Pottmeyer-Gerber, H. Schmidt et S. Nick. 1986. "Glutathione augments the activation of cytotoxic T lymphocytes in vivo". Immunobiology, vol. 172, p. 151-6.

DROST, A. C., D. G. Burleson, W. G. Cioffi Jr, B. S. Jordan, A. D. Mason Jr et B. A. Pruitt Jr. 1993. "Plasma cytokines following thermal injury and their relationship with patient mortality, burn size, and time postburn". Journal of Trauma, vol. 35, p. 335-9.

DUNN, A. J. 2000. "Cytokine activation of the HPA axis". Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 917, p. 608-17.

EAGLE, H., C. Washington et S. M. Friedman. 1966. "The synthesis of homocystine, cystathionine, and cystine by cultured diploid and heteroploid human cells". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 56, p. 156-63.

ECK, H. P. et W. Droege. 1989. "Influence of the extracellular glutamate concentration on the intracellular cyst(e)ine concentration in macrophages and on the capacity to release cysteine". Biological Chemistry Hoppe-Seyler, vol. 370, p. 109-13.

EDINGER, A. L. et C. B. Thompson. 2002. "Antigen-presenting cells control T cell proliferation by regulating amino acid availability". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 99, p. 1107-9.

ELENKOV, I. J., R. L. Wilder, G. P. Chrousos et E. S. Vizi. 2000. "The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system". Pharmacological Reviews, vol. 52, p. 595-638.

EMPTOZ-BONNETON, A., J.C. Crave, H. Lejeune, C. Brébant, et M. Pugeat. 1997. "Corticosteroid-binding globulin synthesis regulation by cytokines and glucocorticoids in human hepatoblastoma-derived (HepG2) cells". Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 82, p. 3758-62.

ENGELAND, W. C., B. K. Levay-Young, L. M. Rogers et D. Fitzgerald. 1997. "Differential gene expression of cytochrome P450 11beta-hydroxylase in rat adrenal cortex after in vivo activation". Endocrinology, vol. 138, p. 2338-46.

EPSTEIN, M. D., D. R. Banducci et E. K. Manders. 1992. "The role of the gastrointestinal tract in the development of burn sepsis". Plastic and Reconstructive Surgery, vol. 90, p. 524-31.

EPSTEIN, M. D., J. I. Tchervenkov, J. W. Alexander, J. R. Johnson et J. W. Vester. 1991. "Increased gut permeability following burn trauma". Archives of Surgery, vol. 126, p. 198-200.

ERLACHER, M., M. Knoflach, I. E. Stec, G. Bock, G. Wick et G. J. Wiegers. 2005. "TCR signaling inhibits glucocorticoid-induced apoptosis in murine thymocytes depending on the stage of development". European Journal of Immunology, vol. 35, p. 3287-96.

ESCHER, G., I. Galli, B. S. Vishwanath, B. M. Frey et F. J. Frey. 1997. "Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta enhance the cortisone/cortisol shuttle". Journal of Experimental Medicine, vol. 186, p. 189-98.

- EVAGELATOU, M., S. L. Peterson et B. A. Cooke. 1997. "Leukocytes modulate 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11beta-HSD) activity in human granulosa-lutein cell cultures". Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 133, p. 81-8.
- EYLAR, E. H., I. Baez, A. Vazquez et Y. Yamamura. 1995. "N-acetylcysteine (NAC) enhances interleukin-2 but suppresses interleukin-4 secretion from normal and HIV+ CD4+ T-cells". Cellular and Molecular Biology, vol. 41 Suppl 1, p. S35-40.
- FANG, C. H., B. G. Li, D. R. Fischer, J. J. Wang, H. A. Runnels, J. J. Monaco et P. O. Hasselgren. 2000. "Burn injury upregulates the activity and gene expression of the 20 S proteasome in rat skeletal muscle". Clin Sci (Lond), vol. 99, p. 181-7.
- FANG, C. H., G. Tiao, H. James, C. Ogle, J. E. Fischer et P. O. Hasselgren. 1995. "Burn injury stimulates multiple proteolytic pathways in skeletal muscle, including the ubiquitin-energy-dependent pathway". Journal of the American College of Surgeons, vol. 180, p. 161-70.
- FAZAL, N. et W. M. Al-Ghoul. 2007. "Thermal injury-plus-sepsis contributes to a substantial deletion of intestinal mesenteric lymph node CD4 T cell via apoptosis". Int J Biol Sci, vol. 3, p. 393-401.
- FAZAL, N., M. A. Choudhry et M. M. Sayeed. 2005. "Inhibition of T cell MAPKs (Erk 1/2, p38) with thermal injury is related to down-regulation of Ca<sup>2+</sup> signaling". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1741, p. 113-9.
- FERRARA, J. J., R. D. Peterson, R. Hester, A. Luterman et P. W. Curreri. 1989. "Inhibition of lymphocyte blastogenesis caused by suppression of interleukin-2 receptor sites after thermal injury". Journal of Burn Care and Rehabilitation, vol. 10, p. 119-24.
- FINNERTY, C. C., D. N. Herndon, R. Przkora, C. T. Pereira, H. M. Oliveira, D. M. Queiroz, A. M. Rocha et M. G. Jeschke. 2006. "Cytokine expression profile over time in severely burned pediatric patients". Shock, vol. 26, p. 13-9.
- FLESCHER, E., H. Tripoli, K. Salnikow et F. J. Burns. 1998. "Oxidative stress suppresses transcription factor activities in stimulated lymphocytes". Clinical and Experimental Immunology, vol. 112, p. 242-7.
- FONG, T. C. et T. Makinodan. 1989. "Preferential enhancement by 2-mercaptoethanol of IL-2 responsiveness of T blast cells from old over young mice is associated with potentiated protein kinase C translocation". Immunology Letters, vol. 20, p. 149-54.
- FREEMAN, L., M. Hewison, S. V. Hughes, K. N. Evans, D. Hardie, T. K. Means et R. Chakraverty. 2005. "Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 permits regulation of glucocorticoid bioavailability by human dendritic cells". Blood, vol. 106, p. 2042-9.
- FRUCHTER, O., E. Zoumakis, S. Alesci, M. De Martino, G. Chrousos et Z. Hochberg. 2006. "Intracrine modulation of gene expression by intracellular generation of active glucocorticoids". Steroids, vol. 71, p. 1001-6.

FUCHS, P. C. h., A. Groger, A. Bozkurt, D. Johnen, T. Wolter et N. Pallua. 2007. "Cortisol in severely burned patients: investigations on disturbance of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis". Shock, vol. 28, p. 662-667.

FUKUZUKA, K., C. K. Edwards 3rd, M. Clare-Salzer, E. M. Copeland 3rd, L. L. Moldawer et D. W. Mozingo. 2000. "Glucocorticoid and Fas ligand induced mucosal lymphocyte apoptosis after burn injury". Journal of Trauma, vol. 49, p. 710-6.

FUKUZUKA, K., C. K. Edwards 3rd, M. Clare-Salzler, E. M. Copeland 3rd, L. L. Moldawer et D. W. Mozingo. 2000. "Glucocorticoid-induced, caspase-dependent organ apoptosis early after burn injury". Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, vol. 278, p. R1005-18.

GALON, J., D. Franchimont, N. Hiroi, G. Frey, A. Boettner, M. Ehrhart-Bornstein, J. J. O'Shea, G. P. Chrousos et S. R. Bornstein. 2002. "Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells". FASEB Journal, vol. 16, p. 61-71.

GARREL, D., R. 1996. "Corticosteroid-binding globulin during inflammation and burn injury: nutritional modulation and clinical implications". Hormone Research, vol. 45, p. 245-51.

GATTI, G., R. Cavallo, M. L. Sartori, D. del Ponte, R. Masera, A. Salvadori, R. Carignola et A. Angeli. 1987. "Inhibition by cortisol of human natural killer (NK) cell activity". Journal of Steroid Biochemistry, vol. 26, p. 49-58.

GENNARI, R. et J. W. Alexander. 1995. "Anti-interleukin-6 antibody treatment improves survival during gut-derived sepsis in a time-dependent manner by enhancing host defense". Critical Care Medicine, vol. 23, p. 1945-53.

GEORGE, M. et J. H. VAUGHAN. 1962. "In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity". Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, vol. 111, p. 514-21.

GIANOTTI, L., J. W. Alexander, T. Pyles, L. James et G. F. Babcock. 1993. "Relationship between extent of burn injury and magnitude of microbial translocation from the intestine". Journal of Burn Care and Rehabilitation, vol. 14, p. 336-42.

GIANOTTI, L., M. Braga, R. Vaiani, F. Almondo et V. Di Carlo. 1996. "Experimental gut-derived endotoxaemia and bacteraemia are reduced by systemic administration of monoclonal anti-LPS antibodies". Burns, vol. 22, p. 120-4.

GILMOUR, J. S., A. E. Coutinho, J. F. Cailhier, T. Y. Man, M. Clay, G. Thomas, H. J. Harris, J. J. Mullins, J. R. Seckl, J. S. Savill et K. E. Chapman. 2006. "Local amplification of glucocorticoids by 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 promotes macrophage phagocytosis of apoptotic leukocytes". Journal of Immunology, vol. 176, p. 7605-11.

GMUNDER, H. et W. Droege. 1991. "Differential effects of glutathione depletion on T cell subsets". Cellular Immunology, vol. 138, p. 229-37.

- GMUNDER, H., H. P. Eck et W. Droege. 1991. "Low membrane transport activity for cystine in resting and mitogenically stimulated human lymphocyte preparations and human T cell clones". European Journal of Biochemistry, vol. 201, p. 113-7.
- GMUNDER, H., S. Roth, H. P. Eck, H. Gallas, S. Mihm et W. Droege. 1990. "Interleukin-2 mRNA expression, lymphokine production and DNA synthesis in glutathione-depleted T cells". Cellular Immunology, vol. 130, p. 520-8.
- GODFREY, D. I., J. F. Purton, R. L. Boyd et T. J. Cole. 2000. "Stress-free T-cell development: glucocorticoids are not obligatory". Immunology Today, vol. 21, p. 606-11.
- GOLEVA, E., K. O. Kisich et D. Y. Leung. 2002. "A role for STAT5 in the pathogenesis of IL-2-induced glucocorticoid resistance". Journal of Immunology, vol. 169, p. 5934-40.
- GONZALO, J. A., A. Gonzalez-Garcia, C. Martinez et G. Kroemer. 1993. "Glucocorticoid-mediated control of the activation and clonal deletion of peripheral T cells in vivo". Journal of Experimental Medicine, vol. 177, p. 1239-46.
- GOODE, H. F., H. C. Cowley, B. E. Walker, P. D. Howdle et N. R. Webster. 1995. "Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction". Critical Care Medicine, vol. 23, p. 646-51.
- GOODMAN, M. G. et W. O. Weigle. 1977. "Nonspecific activation of murine lymphocytes. I. Proliferation and polyclonal activation induced by 2-mercaptoethanol and alpha-thioglycerol". Journal of Experimental Medicine, vol. 145, p. 473-89.
- GOTTESDIENER, K. M., B. A. Karpinski, T. Lindsten, J. L. Strominger, N. H. Jones, C. B. Thompson et J. M. Leiden. 1988. "Isolation and structural characterization of the human 4F2 heavy-chain gene, an inducible gene involved in T-lymphocyte activation". Molecular and Cellular Biology, vol. 8, p. 3809-19.
- GOUGEROT-POCIDALO, M. A., M. Fay, Y. Roche et S. Chollet-Martin. 1988. "Mechanisms by which oxidative injury inhibits the proliferative response of human lymphocytes to PHA. Effect of the thiol compound 2-mercaptoethanol". Immunology, vol. 64, p. 281-8.
- GOULDING, N. J. 2004. "The molecular complexity of glucocorticoid actions in inflammation - a four-ring circus". Curr Opin Pharmacol, vol. 4, p. 629-36.
- GOULDING, N. J., H. S. Euzger, S. K. Butt et M. Perretti. 1998. "Novel pathways for glucocorticoid effects on neutrophils in chronic inflammation". Inflammation Research, vol. 47 Suppl 3, p. S158-65.
- GOUT, P. W., A. R. Buckley, C. R. Simms et N. Bruchovsky. 2001. "Sulfasalazine, a potent suppressor of lymphoma growth by inhibition of the x(c)- cystine transporter: a new action for an old drug". Leukemia, vol. 15, p. 1633-40.

- GRANELLI-PIPERNO, A., P. Nolan, K. Inaba et R. M. Steinman. 1990. "The effect of immunosuppressive agents on the induction of nuclear factors that bind to sites on the interleukin 2 promoter". Journal of Experimental Medicine, vol. 172, p. 1869-72.
- GRBIC, J. T., J. A. Mannick, D. B. Gough et M. L. Rodrick. 1991. "The role of prostaglandin E2 in immune suppression following injury". Annals of Surgery, vol. 214, p. 253-62; discussion 262-3.
- GRUNFELD, J. P. 1990. "Glucocorticoids in blood pressure regulation". Hormone Research, vol. 34, p. 111-3.
- HADZIC, T., L. Li, N. Cheng, S. A. Walsh, D. R. Spitz et C. M. Knudson. 2005. "The role of low molecular weight thiols in T lymphocyte proliferation and IL-2 secretion". Journal of Immunology, vol. 175, p. 7965-72.
- HAHN, E. L., H. H. Tai, L. K. He et R. L. Gamelli. 1999. "Burn injury with infection alters prostaglandin E2 synthesis and metabolism". Journal of Trauma, vol. 47, p. 1052-7; discussion 1057-9.
- HAMID, Q. A., S. E. Wenzel, P. J. Hauk, A. Tsicopoulos, B. Wallaert, J. J. Lafitte, G. P. Chrousos, S. J. Szefler et D. Y. Leung. 1999. "Increased glucocorticoid receptor beta in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma". American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, vol. 159, p. 1600-4.
- HAMILOS, D. L., D. Y. Leung, S. Muro, A. M. Kahn, S. S. Hamilos, S. E. Thawley et Q. A. Hamid. 2001. "GRbeta expression in nasal polyp inflammatory cells and its relationship to the anti-inflammatory effects of intranasal fluticasone". Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 108, p. 59-68.
- HAMMOND, G. L., C. L. Smith, N. A. Paterson et W. J. Sibbald. 1990. "A role for corticosteroid-binding globulin in delivery of cortisol to activated neutrophils". Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 71, p. 34-9.
- HARRIS, B. H. et J. A. Gelfand. 1995. "The immune response to trauma". Seminars in Pediatric Surgery, vol. 4, p. 77-82.
- HASKO, G. et C. Szabo. 1999. "IL-12 as a therapeutic target for pharmacological modulation in immune-mediated and inflammatory diseases: regulation of T helper 1/T helper 2 responses". British Journal of Pharmacology, vol. 127, p. 1295-304.
- HASSELGREN, P. O. 2000. "Catabolic response to stress and injury: implications for regulation". World Journal of Surgery, vol. 24, p. 1452-9.
- HAUK, P. J., E. Goleva, I. Strickland, A. Vottero, G. P. Chrousos, K. O. Kisich et D. Y. Leung. 2002. "Increased glucocorticoid receptor Beta expression converts mouse hybridoma cells to a corticosteroid-insensitive phenotype". American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, vol. 27, p. 361-7.

HAWES, A. S., R. P. Richardson, A. C. Antonacci et S. E. Calvano. 1995. "Chronic pathophysiologic elevation of corticosterone after thermal injury or thermal injury and burn wound infection adversely affects body mass, lymphocyte numbers, and outcome". Journal of Burn Care and Rehabilitation, vol. 16, p. 1-15.

HAYASHI, R., H. Wada, K. Ito et I. M. Adcock. 2004. "Effects of glucocorticoids on gene transcription". European Journal of Pharmacology, vol. 500, p. 51-62.

HAYNES, B. F., M. E. Hemler, D. L. Mann, G. S. Eisenbarth, J. Shelhamer, H. S. Mostowski, C. A. Thomas, J. L. Strominger et A. S. Fauci. 1981. "Characterization of a monoclonal antibody (4F2) that binds to human monocytes and to a subset of activated lymphocytes". Journal of Immunology, vol. 126, p. 1409-14.

HEBER-KATZ, E. et R. E. Click. 1972. "Immune responses in vitro. V. Role of mercaptoethanol in the mixed-leukocyte reaction". Cellular Immunology, vol. 5, p. 410-8.

HEHNER, S. P., R. Breitkreutz, G. Shubinsky, H. Unsoeld, K. Schulze-Osthoff, M. L. Schmitz et W. Droege. 2000. "Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool". Journal of Immunology, vol. 165, p. 4319-28.

HEIKKILA, P., J. Arola, J. Liu et A. I. Kahri. 1998. "ACTH regulates LDL receptor and CLA-1 mRNA in the rat adrenal cortex". Endocrine Research, vol. 24, p. 591-3.

HENCH, P. S., E. C. KENDALL et al. et. 1949. "The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis". Mayo Clinic Proceedings, vol. 24, p. 181-97.

HENNEBOLD, J. D., S. Y. Ryu, H. H. Mu, A. Galbraith et R. A. Daynes. 1996. "11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase modulation of glucocorticoid activities in lymphoid organs". American Journal of Physiology, vol. 270, p. R1296-306.

HERNANDEZ-HOYOS, G., S. J. Sohn, E. V. Rothenberg et J. Alberola-Illa. 2000. "Lck activity controls CD4/CD8 T cell lineage commitment". Immunity, vol. 12, p. 313-22.

HEW, M., P. Bhavsar, A. Torrego, S. Meah, N. Khorasani, P. J. Barnes, I. Adcock et K. F. Chung. 2006. "Relative corticosteroid insensitivity of peripheral blood mononuclear cells in severe asthma". American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, vol. 174, p. 134-41.

HILDEMAN, D. A., T. Mitchell, T. K. Teague, P. Henson, B. J. Day, J. Kappler et P. C. Marrack. 1999. "Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis". Immunity, vol. 10, p. 735-44.

HONDA, M., F. Orii, T. Ayabe, S. Imai, T. Ashida, T. Obara et Y. Kohgo. 2000. "Expression of glucocorticoid receptor beta in lymphocytes of patients with glucocorticoid-resistant ulcerative colitis". Gastroenterology, vol. 118, p. 859-66.

HORGAN, A. F., M. V. Mendez, D. S. O'Riordain, R. G. Holzheimer, J. A. Mannick et M. L. Rodrick. 1994. "Altered gene transcription after burn injury results in depressed T-lymphocyte activation". Annals of Surgery, vol. 220, p. 342-51; discussion 351-2.

HORIGOME, H., M. Homma, T. Hiran, K. Oka, T. Niitsuma et T. Hayashi. 2001. "Magnolol from Magnolia officinalis inhibits 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase without increases of corticosterone and thymocyte apoptosis in mice". Planta Medecine, vol. 67, p. 33-7.

HORTON, J. W. 2003. "Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy". Toxicology, vol. 189, p. 75-88.

HORTON, J. W., D. J. White, D. L. Maass, D. P. Hybki, S. Haudek et B. Giroir. 2001. "Antioxidant vitamin therapy alters burn trauma-mediated cardiac NF-kappaB activation and cardiomyocyte cytokine secretion". Journal of Trauma, vol. 50, p. 397-406; discussion 407-8.

HOSNUTER, M., A. Gurel, O. Babuccu, F. Armutcu, E. Kargi et A. Isikdemir. 2004. "The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury". Burns, vol. 30, p. 121-5.

IIJIMA, N., Y. Yanagawa, K. Iwabuchi et K. Onoe. 2003. "Selective regulation of CD40 expression in murine dendritic cells by thiol antioxidants". Immunology, vol. 110, p. 197-205.

IMHOF, B. A., M. A. Deugnier, J. M. Girault, S. Champion, C. Damais, T. Itoh et J. P. Thiery. 1988. "Thymotaxin: a thymic epithelial peptide chemotactic for T-cell precursors". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 85, p. 7699-703.

IRUSEN, E., J. G. Matthews, A. Takahashi, P. J. Barnes, K. F. Chung et I. M. Adcock. 2002. "p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma". Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 109, p. 649-57.

ISHIGURO, Y., T. Ohkawara, H. Sakuraba, K. Yamagata, H. Hiraga, S. Yamaguchi, S. Fukuda, A. Munakata, A. Nakane et J. Nishihira. 2006. "Macrophage migration inhibitory factor has a proinflammatory activity via the p38 pathway in glucocorticoid-resistant ulcerative colitis". Clinical Immunology, vol. 120, p. 335-41.

ISHII, T., S. Bannai et Y. Sugita. 1981. "Mechanism of growth stimulation of L1210 cells by 2-mercaptoethanol in vitro. Role of the mixed disulfide of 2-mercaptoethanol and cysteine". Journal of Biological Chemistry, vol. 256, p. 12387-92.

ISHII, T., K. Itoh, S. Takahashi, H. Sato, T. Yanagawa, Y. Katoh, S. Bannai et M. Yamamoto. 2000. "Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages". Journal of Biological Chemistry, vol. 275, p. 16023-9.

ISHII, T., H. Masuzaki, T. Tanaka, N. Arai, S. Yasue, N. Kobayashi, T. Tomita, M. Noguchi, J. Fujikura, K. Ebihara, K. Hosoda et K. Nakao. 2007. "Augmentation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in LPS-activated J774.1 macrophages--role of 11beta-HSD1 in pro-inflammatory properties in macrophages". FEBS Letters, vol. 581, p. 349-54..

ISHII, T., K. Nakayama, H. Sato, K. Miura, M. Yamada, K. Yamada, Y. Sugita et S. Bannai. 1991. "Expression of the mouse macrophage cystine transporter in *Xenopus laevis* oocytes". Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 289, p. 71-5.

ISMAILI, N. et M. J. Garabedian. 2004. "Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation". Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 1024, p. 86-101.

ITANO, A., P. Salmon, D. Kioussis, M. Tolaini, P. Corbella et E. Robey. 1996. "The cytoplasmic domain of CD4 promotes the development of CD4 lineage T cells". Journal of Experimental Medicine, vol. 183, p. 731-41.

ITO, K., P. J. Barnes et I. M. Adcock. 2000. "Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12". Molecular and Cellular Biology, vol. 20, p. 6891-903.

ITO, K., S. Lim, G. Caramori, K. F. Chung, P. J. Barnes et I. M. Adcock. 2001. "Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages". FASEB Journal, vol. 15, p. 1110-2.

ITO, K., S. Yamamura, S. Essilfie-Quaye, B. Cosio, M. Ito, P. J. Barnes et I. M. Adcock. 2006. "Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression". Journal of Experimental Medicine, vol. 203, p. 7-13.

IWATA, M., S. Hanaoka et K. Sato. 1991. "Rescue of thymocytes and T cell hybridomas from glucocorticoid-induced apoptosis by stimulation via the T cell receptor/CD3 complex: a possible in vitro model for positive selection of the T cell repertoire". European Journal of Immunology, vol. 21, p. 643-8.

IWATA, M., T. Kuwata, M. Mukai, Y. Tozawa et M. Yokoyama. 1996. "Differential induction of helper and killer T cells from isolated CD4+CD8+ thymocytes in suspension culture". European Journal of Immunology, vol. 26, p. 2081-6.

IWATA, S., T. Hori, N. Sato, Y. Ueda-Taniguchi, T. Yamabe, H. Nakamura, H. Masutani et J. Yodoi. 1994. "Thiol-mediated redox regulation of lymphocyte proliferation. Possible involvement of adult T cell leukemia-derived factor and glutathione in transferrin receptor expression". Journal of Immunology, vol. 152, p. 5633-42.

JAMIESON, C. A. et K. R. Yamamoto. 2000. "Crosstalk pathway for inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis by T cell receptor signaling". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 97, p. 7319-24.

JEANNIN, P., Y. Delneste, S. Lecoanet-Henchoz, J. F. Gauchat, P. Life, D. Holmes et J. Y. Bonnefoy. 1995. "Thiols decrease human interleukin (IL) 4 production and IL-4-induced immunoglobulin synthesis". Journal of Experimental Medicine, vol. 182, p. 1785-92.

JENKINSON, E. J., S. Parnell, J. Shuttleworth, J. J. Owen et G. Anderson. 1999. "Specialized ability of thymic epithelial cells to mediate positive selection does not require expression of the steroidogenic enzyme p450scc". Journal of Immunology, vol. 163, p. 5781-5.

JOBIN, N., D. Garrel et J. Bernier. 2000. "Increased serum-soluble interleukin-2 receptor in burn patients: characterization and effects on the immune system". Human Immunology, vol. 61, p. 233-46.

JONES, W. G. 2nd, J. P. Minei, R. P. Richardson, T. J. Fahey 3rd, S. E. Calvano, A. C. Antonacci, G. T. Shires 3rd et G. T. Shires. 1990. "Pathophysiologic glucocorticoid elevations promote bacterial translocation after thermal injury". Infection and Immunity, vol. 58, p. 3257-61.

JOYCE, D. A., G. Gimblett et J. H. Steer. 2001. "Targets of glucocorticoid action on TNF-alpha release by macrophages". Inflammation Research, vol. 50, p. 337-40.

JOYCE, D. A., A. Kloda et J. H. Steer. 1997. "Dexamethasone suppresses release of soluble TNF receptors by human monocytes concurrently with TNF-alpha suppression". Immunology and Cell Biology, vol. 75, p. 345-50.

KANG, M. W., J. Y. Jang, J. Y. Choi, S. H. Kim, J. Oh, B. S. Cho et C. E. Lee. 2008. "Induction of IFN-gamma gene expression by thioredoxin: positive feed-back regulation of Th1 response by thioredoxin and IFN-gamma". Cellular Physiology and Biochemistry, vol. 21, p. 215-24.

KARPINSKI, B. A., L. H. Yang, P. Cacheris, G. D. Morle et J. M. Leiden. 1989. "The first intron of the 4F2 heavy-chain gene contains a transcriptional enhancer element that binds multiple nuclear proteins". Molecular and Cellular Biology, vol. 9, p. 2588-97.

KASSEL, O., A. Sancono, J. Kratzschmar, B. Kreft, M. Stassen et A. C. Cato. 2001. "Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1". EMBO Journal, vol. 20, p. 7108-16.

KATARANOVSKI, M., D. Kataranovski, D. Savic, G. Jovicic, Z. Bogdanovic et T. Jovanovic. 1998. "Granulocyte and plasma cytokine activity in acute cadmium intoxication in rats". Physiological Research, vol. 47, p. 453-61.

KATO, T., S. Tada-Oikawa, K. Takahashi, K. Saito, L. Wang, A. Nishio, R. Hakamada-Taguchi, S. Kawanishi et K. Kurabayashi. 2006. "Endocrine disruptors that deplete glutathione levels in APC promote Th2 polarization in mice leading to the exacerbation of airway inflammation". European Journal of Immunology, vol. 36, p. 1199-209.

KAVANAGH, E. G., J. L. Kelly, A. Lyons, C. C. Soberg, J. A. Mannick et J. A. Lederer. 1998. "Burn injury primes naive CD4+ T cells for an augmented T-helper 1 response". Surgery, vol. 124, p. 269-76; discussion 276-7.

KAVANAGH, T. J., A. Grossmann, E. P. Jaecks, J. C. Jinneman, D. L. Eaton, G. M. Martin et P. S. Rabinovitch. 1990. "Proliferative capacity of human peripheral blood lymphocytes sorted on the basis of glutathione content". Journal of Cellular Physiology, vol. 145, p. 472-80.

KEEL, M. et O. Trentz. 2005. "Pathophysiology of polytrauma". Injury, vol. 36, p. 691-709.

- KEENEY, D. S., C. M. Jenkins et M. R. Waterman. 1995. "Developmentally regulated expression of adrenal 17 alpha-hydroxylase cytochrome P450 in the mouse embryo". Endocrinology, vol. 136, p. 4872-9.
- KEYSE, S. M. 2000. "Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling". Current Opinion in Cell Biology, vol. 12, p. 186-92.
- KIM, J. Y., Y. Kanai, A. Chairoungdua, S. H. Cha, H. Matsuo, D. K. Kim, J. Inatomi, H. Sawa, Y. Ida et H. Endou. 2001. "Human cystine/glutamate transporter: cDNA cloning and upregulation by oxidative stress in glioma cells". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1512, p. 335-44.
- KING, L. B., M. S. Vacchio, K. Dixon, R. Hunziker, D. H. Margulies et J. D. Ashwell. 1995. "A targeted glucocorticoid receptor antisense transgene increases thymocyte apoptosis and alters thymocyte development". Immunity, vol. 3, p. 647-56.
- KINO, T. et G. P. Chrousos. 2002. "Tissue-specific glucocorticoid resistance-hypersensitivity syndromes: multifactorial states of clinical importance". Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 109, p. 609-13.
- KLASSON, D. H. 1951. "Ascorbic acid in the treatment of burns". New York State Journal of Medicine, vol. 51, p. 2388-92.
- KOGKOPOULOU, O., E. Tzakos, G. Mavrothalassitis, C. T. Baldari, F. Paliogianni, H. A. Young et G. Thyphronitis. 2006. "Conditional up-regulation of IL-2 production by p38 MAPK inactivation is mediated by increased Erk1/2 activity". Journal of Leukocyte Biology, vol. 79, p. 1052-60.
- KOHLER, M., H. Haller et E. Hartmann. 1999. "Nuclear protein transport pathways". Experimental Nephrology, vol. 7, p. 290-4.
- KOIKE, K., F. A. Moore, E. E. Moore, R. A. Read, V. S. Carl et A. Banerjee. 1993. "Gut ischemia mediates lung injury by a xanthine oxidase-dependent neutrophil mechanism". Journal of Surgical Research, vol. 54, p. 469-73.
- KOIKE, Y., T. Hisada, M. Utsugi, T. Ishizuka, Y. Shimizu, A. Ono, Y. Murata, J. Hamuro, M. Mori et K. Dobashi. 2007. "Glutathione redox regulates airway hyperresponsiveness and airway inflammation in mice". American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, vol. 37, p. 322-9.
- KONUKOGLU, D., O. Cetinkale et R. Bulan. 1997. "Effects of N-acetylcysteine on lung glutathione levels in rats after burn injury". Burns, vol. 23, p. 541-4.
- KOPRAK, S., M. J. Staruch et F. J. Dumont. 1999. "A specific inhibitor of the p38 mitogen activated protein kinase affects differentially the production of various cytokines by activated human T cells: dependence on CD28 signaling and preferential inhibition of IL-10 production". Cellular Immunology, vol. 192, p. 87-95.

- KOVALOVSKY, D., M. Paez Pereda, J. Sauer, C. Perez Castro, V. E. Nahmod, G. K. Stalla, F. Holsboer et E. Arzt. 1998. "The Th1 and Th2 cytokines IFN-gamma and IL-4 antagonize the inhibition of monocyte IL-1 receptor antagonist by glucocorticoids: involvement of IL-1". European Journal of Immunology, vol. 28, p. 2075-85.
- KRAMER, R. E., J. L. McCarthy, E. R. Simpson et M. R. Waterman. 1983. "Effects of ACTH on steroidogenesis in bovine adrenocortical cells in primary culture--increased secretion of 17 alpha-hydroxylated steroids associated with a refractoriness in total steroid output". Journal of Steroid Biochemistry, vol. 18, p. 715-23.
- KRSTIC, M. D., I. Rogatsky, K. R. Yamamoto et M. J. Garabedian. 1997. "Mitogen-activated and cyclin-dependent protein kinases selectively and differentially modulate transcriptional enhancement by the glucocorticoid receptor". Molecular and Cellular Biology, vol. 17, p. 3947-54.
- KUNG, C. et M. L. Thomas. 1997. "Recent advances in lymphocyte signaling and regulation". Frontiers in Bioscience, vol. 2, p. d207-21.
- KUTLESA, S., J. T. Wessels, A. Speiser, I. Steiert, C. A. Muller et G. Klein. 2002. "E-cadherin-mediated interactions of thymic epithelial cells with CD103+ thymocytes lead to enhanced thymocyte cell proliferation". Journal of Cell Science, vol. 115, p. 4505-15.
- KWON, B., K. Y. Yu, J. Ni, G. L. Yu, I. K. Jang, Y. J. Kim, L. Xing, D. Liu, S. X. Wang et B. S. Kwon. 1999. "Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 6056-61.
- LADI, E., X. Yin, T. Chtanova et E. A. Robey. 2006. "Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection". Nat Immunol, vol. 7, p. 338-43.
- LALONDE, C., U. Nayak, J. Hennigan et R. Demling. 1997. "Plasma catalase and glutathione levels are decreased in response to inhalation injury". Journal of Burn Care and Rehabilitation, vol. 18, p. 515-9.
- LANZAVECCHIA, A. et F. Sallusto. 2001. "Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination". Nat Immunol, vol. 2, p. 487-92.
- LASA, M., S. M. Abraham, C. Boucheron, J. Saklatvala et A. R. Clark. 2002. "Dexamethasone causes sustained expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 and phosphatase-mediated inhibition of MAPK p38". Molecular and Cellular Biology, vol. 22, p. 7802-11.
- LASTRO, M., A. Kourtidis, K. Farley et D. S. Conklin. 2008. "xCT expression reduces the early cell cycle requirement for calcium signaling". Cellular Signalling, vol. 20, p. 390-9.
- LECHNER, O., H. Dietrich, G. J. Wiegers, M. Vacchio et G. Wick. 2001. "Glucocorticoid production in the chicken bursa and thymus". International Immunology, vol. 13, p. 769-76.

LECHNER, O., G. J. Wiegers, A. J. Oliveira-Dos-Santos, H. Dietrich, H. Recheis, M. Waterman, R. Boyd et G. Wick. 2000. "Glucocorticoid production in the murine thymus". European Journal of Immunology, vol. 30, p. 337-46.

LEE, M. G., S. O. Sharrow, A. G. Farr, A. Singer et M. C. Udey. 1994. "Expression of the homotypic adhesion molecule E-cadherin by immature murine thymocytes and thymic epithelial cells". Journal of Immunology, vol. 152, p. 5653-9.

LEIDEN, J. M., L. H. Yang, G. D. Morle, C. H. June, T. Lindsten, C. B. Thompson et B. Karpinski. 1989. "The 4F2 heavy chain gene: a molecular model of inducible gene expression in human T cells". Journal of Autoimmunity, vol. 2 Suppl, p. 67-79.

LENG, L., C. N. Metz, Y. Fang, J. Xu, S. Donnelly, J. Baugh, T. Delohery, Y. Chen, R. A. Mitchell et R. Bucala. 2003. "MIF signal transduction initiated by binding to CD74". Journal of Experimental Medicine, vol. 197, p. 1467-76.

LEON, L. R., M. D. Blaha et D. A. DuBose. 2006. "Time course of cytokine, corticosterone, and tissue injury responses in mice during heat strain recovery". Journal of Applied Physiology, vol. 100, p. 1400-9.

LEPOSAVIC G. and M. PERISIC. 2008. "Age-associated remodeling of thymopoiesis: role for gonadal hormones and catecholamines". Neuroimmunomodulation, vol. 15, p. 290-322.

LEUNG, D. Y., M. de Castro, S. J. Szefler et G. P. Chrousos. 1998. "Mechanisms of glucocorticoid-resistant asthma". Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 840, p. 735-46.

LEUNG, D. Y., Q. Hamid, A. Vottero, S. J. Szefler, W. Surs, E. Minshall, G. P. Chrousos et D. J. Klemm. 1997. "Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta". Journal of Experimental Medicine, vol. 186, p. 1567-74.

LEVENSON, S. M., D. K. Gruber, C. Gruber, R. Lent et E. Seifert. 1981. "Chemical debridement of burns: mercaptans". Journal of Trauma, vol. 21, p. 632-44.

LI, L. B., E. Goleva, C. F. Hall, L. S. Ou et D. Y. Leung. 2004. "Superantigen-induced corticosteroid resistance of human T cells occurs through activation of the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK-ERK) pathway". Journal of Allergy and Clinical Immunology, vol. 114, p. 1059-69.

LI, W., L. Gao, Y. Wang, T. Duan, L. Myatt et K. Sun. 2006. "Enhancement of cortisol-induced 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression by interleukin 1beta in cultured human chorionic trophoblast cells". Endocrinology, vol. 147, p. 2490-5.

LI, X., S. N. Rana, E. J. Kovacs, R. L. Gamelli, I. H. Chaudry et M. A. Choudhry. 2005. "Corticosterone suppresses mesenteric lymph node T cells by inhibiting p38/ERK pathway and promotes bacterial translocation after alcohol and burn injury". Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, vol. 289, p. R37-44.

LI, X., M. G. Schwacha, I. H. Chaudry et M. A. Choudhry. 2006. "A role of PP1/PP2A in mesenteric lymph node T cell suppression in a two-hit rodent model of alcohol intoxication and injury". Journal of Leukocyte Biology, vol. 79, p. 453-62.

LIANG, C. M., N. Lee, D. Cattell et S. M. Liang. 1989. "Glutathione regulates interleukin-2 activity on cytotoxic T-cells". Journal of Biological Chemistry, vol. 264, p. 13519-23.

LIBERMAN, A. C., D. Refojo, J. Druker, M. Toscano, T. Rein, F. Holsboer et E. Arzt. 2007. "The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction". FASEB Journal, vol. 21, p. 1177-88.

LIDEN, J., F. Delaunay, I. Rafter, J. Gustafsson et S. Okret. 1997. "A new function for the C-terminal zinc finger of the glucocorticoid receptor. Repression of RelA transactivation". Journal of Biological Chemistry, vol. 272, p. 21467-72.

LIM, M. C., M. J. Shipston et F. A. Antoni. 2002. "Posttranslational modulation of glucocorticoid feedback inhibition at the pituitary level". Endocrinology, vol. 143, p. 3796-801.

LINDSTEN, T., C. H. June, C. B. Thompson et J. M. Leiden. 1988. "Regulation of 4F2 heavy-chain gene expression during normal human T-cell activation can be mediated by multiple distinct molecular mechanisms". Molecular and Cellular Biology, vol. 8, p. 3820-6.

LIU, D. H., Y. P. Su, W. Zhang, S. F. Lou, X. Z. Ran, J. S. Gao et T. M. Cheng. 2002. "Downregulation of glucocorticoid receptors of liver cytosols and the role of the inflammatory cytokines in pathological stress in scalded rats". Burns, vol. 28, p. 315-20.

LIU, E., S. Sinha, C. Williams, M. Cyrille, E. Heller, S. B. Snapper, K. Georgopoulos, R. St-Arnaud, T. Force, S. Dedhar et R. E. Gerszten. 2005. "Targeted deletion of integrin-linked kinase reveals a role in T-cell chemotaxis and survival". Molecular and Cellular Biology, vol. 25, p. 11145-55.

LOHRER, P., J. Gloddek, A. C. Nagashima, Z. Korali, U. Hopfner, M. P. Pereda, E. Arzt, G. K. Stalla et U. Renner. 2000. "Lipopolysaccharide directly stimulates the intrapituitary interleukin-6 production by folliculostellate cells via specific receptors and the p38alpha mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-kappaB pathway". Endocrinology, vol. 141, p. 4457-65.

LOMBARDI, G., G. Miglio, C. Dianzani, R. Mesturini, F. Varsaldi, A. Chiocchetti, U. Dianzani et R. Fantozzi. 2004. "Glutamate modulation of human lymphocyte growth: in vitro studies". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 318, p. 496-502.

LOS, M., W. Droege, K. Stricker, P. A. Baeuerle et K. Schulze-Osthoff. 1995. "Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions". European Journal of Immunology, vol. 25, p. 159-65.

LOWENBERG, M., A. P. Verhaar, G. R. van den Brink et D. W. Hommes. 2007. "Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression". Trends Mol Med, vol. 13, p. 158-63.

LU, F. W., K. Yasutomo, G. B. Goodman, L. J. McHeyzer-Williams, M. G. McHeyzer-Williams, R. N. Germain et J. D. Ashwell. 2000. "Thymocyte resistance to glucocorticoids leads to antigen-specific unresponsiveness due to "holes" in the T cell repertoire". *Immunity*, vol. 12, p. 183-92.

LUMADUE, J. A., A. B. Glick et F. H. Ruddle. 1987. "Cloning, sequence analysis, and expression of the large subunit of the human lymphocyte activation antigen 4F2". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 84, p. 9204-8.

LUSCHER, B., M. Rousseaux, R. Lees, H. R. MacDonald et C. Bron. 1985. "Cell surface glycoproteins involved in the stimulation of interleukin 1-dependent interleukin 2 production by a subline of EL4 thymoma cells. II. Structure, biosynthesis, and maturation". *Journal of Immunology*, vol. 135, p. 3951-7.

LYSON, K. et S. M. McCann. 1993. "Alpha-melanocyte-stimulating hormone abolishes IL-1- and IL-6-induced corticotropin-releasing factor release from the hypothalamus in vitro". *Neuroendocrinology*, vol. 58, p. 191-5.

MALDONADO, M. D., F. Murillo-Cabezas, J. R. Calvo, P. J. Lardone, D. X. Tan, J. M. Guerrero et R. J. Reiter. 2007. "Melatonin as pharmacologic support in burn patients: a proposed solution to thermal injury-related lymphocytopenia and oxidative damage". *Critical Care Medicine*, vol. 35, p. 1177-85.

MARCHETTI, M. C., B. D. Marco, M. C. Santini, A. Bartoli, D. V. Delfino et C. Riccardi. 2003. "Dexamethasone-induced thymocytes apoptosis requires glucocorticoid receptor nuclear translocation but not mitochondrial membrane potential transition". *Toxicology Letters*, vol. 139, p. 175-80.

MARIDONNEAU-PARINI, I., M. Errasfa et F. Russo-Marie. 1989. "Inhibition of O<sub>2</sub>-generation by dexamethasone is mimicked by lipocortin I in alveolar macrophages". *Journal of Clinical Investigation*, vol. 83, p. 1936-40.

MASFERRER, J. L., K. Seibert, B. Zweifel et P. Needleman. 1992. "Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, p. 3917-21.

MASSON, I., J. Mathieu, X. B. Nolland, M. De Sousa, B. Chanaud, S. Strzalko, Y. Chancerelle, J. F. Kergonou, J. P. Giroud et I. Florentin. 1998. "Role of nitric oxide in depressed lymphoproliferative responses and altered cytokine production following thermal injury in rats". *Cellular Immunology*, vol. 186, p. 121-32.

MASTROBERARDINO, L., B. Spindler, R. Pfeiffer, P. J. Skelly, J. Loffing, C. B. Shoemaker et F. Verrey. 1998. "Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family". *Nature*, vol. 395, p. 288-91.

MATSUI, M., T. Kudo, M. Kudo, H. Ishihara et A. Matsuki. 1991. "The endocrine response after burns". *Agressologie*, vol. 32, p. 233-5.

- MAZZEO, D., S. Sacco, P. Di Lucia, G. Penna, L. Adorini, P. Panina-Bordignon et P. Ghezzi. 2002. "Thiol antioxidants inhibit the formation of the interleukin-12 heterodimer: a novel mechanism for the inhibition of IL-12 production". Cytokine, vol. 17, p. 285-93.
- MCCANN, S. M., J. Antunes-Rodrigues, C. R. Franci, J. A. Anselmo-Franci, S. Karanth et V. Rettori. 2000. "Role of the hypothalamic pituitary adrenal axis in the control of the response to stress and infection". Brazilian Journal of Medical and Biological Research, vol. 33, p. 1121-31.
- MCKAY, L. I. et J. A. Cidlowski. 1999. "Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways". Endocrine Reviews, vol. 20, p. 435-59.
- MEISTER, A. et M. E. Anderson. 1983. "Glutathione". Annual Review of Biochemistry, vol. 52, p. 711-60.
- MESSINA, J. P. et D. A. Lawrence. 1992. "Effects of 2-mercaptoethanol and buthionine sulfoximine on cystine metabolism by and proliferation of mitogen-stimulated human and mouse lymphocytes". International Journal of Immunopharmacology, vol. 14, p. 1221-34.
- MEYER, T., J. A. Gustafsson et J. Carlstedt-Duke. 1997. "Glucocorticoid-dependent transcriptional repression of the osteocalcin gene by competitive binding at the TATA box". DNA and Cell Biology, vol. 16, p. 919-27.
- MILLER, A. C., R. M. Rashid et E. M. Elamin. 2007. "The "T" in trauma: the helper T-cell response and the role of immunomodulation in trauma and burn patients". Journal of Trauma, vol. 63, p. 1407-17.
- MILLER, A. H., R. L. Spencer, B. D. Pearce, T. L. Pisell, Y. Azrieli, P. Tanapat, H. Moday, R. Rhee et B. S. McEwen. 1998. "Glucocorticoid receptors are differentially expressed in the cells and tissues of the immune system". Cellular Immunology, vol. 186, p. 45-54.
- MILLER, A. L., M. S. Webb, A. J. Copik, Y. Wang, B. H. Johnson, R. Kumar et E. B. Thompson. 2005. "p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a key mediator in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells: correlation between p38 MAPK activation and site-specific phosphorylation of the human glucocorticoid receptor at serine 211". Molecular Endocrinology, vol. 19, p. 1569-83.
- MILLER, W. L. 1995. "Mitochondrial specificity of the early steps in steroidogenesis". Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, vol. 55, p. 607-16.
- MINEI, J. P., Y. Fong, M. A. Marano, L. L. Moldawer, W. G. Jones, H. Wei, R. P. Richardson, R. W. Yurt, G. T. Shires 3rd, S. F. Lowry et al. et. 1989. "Hepatocellular membrane function during chronic burn injury". Journal of Surgical Research, vol. 46, p. 311-6.
- MISSLITZ, A., O. Pabst, G. Hintzen, L. Ohl, E. Kremmer, H. T. Petrie et R. Forster. 2004. "Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7". Journal of Experimental Medicine, vol. 200, p. 481-91.

- MITCHELL, R. A., C. N. Metz, T. Peng et R. Bucala. 1999. "Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action". *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, p. 18100-6.
- MIYAMOTO, Y. J., J. S. Mitchell et B. W. McIntyre. 2003. "Physical association and functional interaction between beta1 integrin and CD98 on human T lymphocytes". *Molecular Immunology*, vol. 39, p. 739-51.
- MIYAURA, H. et M. Iwata. 2002. "Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids". *Journal of Immunology*, vol. 168, p. 1087-94.
- MOLINA, P.E. 2005. "Neurobiology of the stress response: contribution of the sympathetic nervous system to the neuroimmune axis in traumatic injury". *Shock*, vol. 24, p. 3-10
- MONICK, M. M., L. Samavati, N. S. Butler, M. Mohning, L. S. Powers, T. Yarovinsky, D. R. Spitz et G. W. Hunninghake. 2003. "Intracellular thiols contribute to Th2 function via a positive role in IL-4 production". *Journal of Immunology*, vol. 171, p. 5107-15.
- MOORE, X. L., I. Hoong et T. J. Cole. 2000. "Expression of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 gene in the mouse". *Kidney International*, vol. 57, p. 1307-12.
- MURATA, Y., T. Shimamura et J. Hamuro. 2002. "The polarization of T(h)1/T(h)2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production". *International Immunology*, vol. 14, p. 201-12.
- MURTON, S. A., S. T. Tan, T. C. Prickett, C. Frampton et R. A. Donald. 1998. "Hormone responses to stress in patients with major burns". *British Journal of Plastic Surgery*, vol. 51, p. 388-92.
- NAKAI, Y., T. Usui, T. Tsukada, H. Takahashi, J. Fukata, M. Fukushima, K. Senoo et H. Imura. 1991. "Molecular mechanisms of glucocorticoid inhibition of human proopiomelanocortin gene transcription". *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 40, p. 301-6.
- NAKANISHI, T., Y. Nishi, E. F. Sato, M. Ishii, T. Hamada et M. Inoue. 1998. "Thermal injury induces thymocyte apoptosis in the rat". *Journal of Trauma*, vol. 44, p. 143-8.
- NAMBIAR, M. P., E. J. Enyedy, C. U. Fisher, V. G. Warke, Y. T. Juang et G. C. Tsokos. 2001. "Dexamethasone modulates TCR zeta chain expression and antigen receptor-mediated early signaling events in human T lymphocytes". *Cellular Immunology*, vol. 208, p. 62-71.
- NARANG, V. S., G. M. Pauletti, P. W. Gout, D. J. Buckley et A. R. Buckley. 2003. "Suppression of cystine uptake by sulfasalazine inhibits proliferation of human mammary carcinoma cells". *Anticancer Research*, vol. 23, p. 4571-9.

NI CHOILEAIN, N., M. MacConmara, Y. Zang, T. J. Murphy, J. A. Mannick et J. A. Lederer. 2006. "Enhanced regulatory T cell activity is an element of the host response to injury". Journal of Immunology, vol. 176, p. 225-36.

NIJHUIS, E. W., B. Hinloopen, J. Odding et L. Nagelkerken. 1994. "Abrogation of the suppressive effects of dexamethasone by PKC activation or CD28 triggering". Cellular Immunology, vol. 156, p. 438-47.

NIJHUIS, E. W., B. Hinloopen, R. A. van Lier et L. Nagelkerken. 1995. "Differential sensitivity of human naive and memory CD4+ T cells for dexamethasone". International Immunology, vol. 7, p. 591-5.

NOCENTINI, G., L. Giunchi, S. Ronchetti, L. T. Krausz, A. Bartoli, R. Moraca, G. Migliorati et C. Riccardi. 1997. "A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 94, p. 6216-21.

NOELLE, R. J. et D. A. Lawrence. 1981. "Determination of glutathione in lymphocytes and possible association of redox state and proliferative capacity of lymphocytes". Biochemical Journal, vol. 198, p. 571-9.

NOGUCHI, T., R. Metz, L. Chen, M. G. Mattei, D. Carrasco et R. Bravo. 1993. "Structure, mapping, and expression of erp, a growth factor-inducible gene encoding a nontransmembrane protein tyrosine phosphatase, and effect of ERP on cell growth". Molecular and Cellular Biology, vol. 13, p. 5195-205.

NORBURY, W., B. Herndon, D.N. Branski, L.K. Chinkes, D.L. et M.G. Jeschke. 2008. "Urinary cortisol and catecholamine excretion after burn injury in children". Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 93, p.1270-5.

NORTHROP, J. P., G. R. Crabtree et P. S. Mattila. 1992. "Negative regulation of interleukin 2 transcription by the glucocorticoid receptor". Journal of Experimental Medicine, vol. 175, p. 1235-45.

NUOTIO-ANTAR, A. M., A. H. Hasty et W. J. Kovacs. 2006. "Quantitation and cellular localization of 11beta-HSD1 expression in murine thymus". Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, vol. 99, p. 93-9.

O'GARRA, A. et N. Arai. 2000. "The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation". Trends in Cell Biology, vol. 10, p. 542-50.

O'SULLIVAN, S. T., J. A. Lederer, A. F. Horgan, D. H. Chin, J. A. Mannick et M. L. Rodrick. 1995. "Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection". Annals of Surgery, vol. 222, p. 482-90; discussion 490-2.

- O'SULLIVAN, S. T. et T. P. O'Connor. 1997. "Immunosuppression following thermal injury: the pathogenesis of immunodysfunction". British Journal of Plastic Surgery, vol. 50, p. 615-23.
- OAKLEY, R. H., M. Sar et J. A. Cidlowski. 1996. "The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function". Journal of Biological Chemistry, vol. 271, p. 9550-9.
- OBIRI, N. et S. B. Pruett. 1988. "The role of thiols in lymphocyte responses: effect of 2-mercaptoethanol on interleukin 2 production". Immunobiology, vol. 176, p. 440-9.
- OCAL, K., D. Avlan, I. Cinel, A. Unlu, C. Ozturk, F. Yaylak, M. Dirlik, H. Camdeviren et S. Aydin. 2004. "The effect of N-acetylcysteine on oxidative stress in intestine and bacterial translocation after thermal injury". Burns, vol. 30, p. 778-84.
- OHMORI, H. et I. Yamamoto. 1981. "Activation of murine lymphocytes by 2-mercaptoethanol and related thiol compounds and its mechanism. I. Relationship between mitogenic activities and augmenting effects on antibody synthesis in vitro". Immunopharmacology, vol. 3, p. 333-45.
- OHMORI, H. et I. Yamamoto. 1983. "Mechanism of augmentation of the antibody response in vitro by 2-mercaptoethanol in murine lymphocytes. III. Serum-bound and oxidized 2-mercaptoethanol are available for the augmentation". Cellular Immunology, vol. 79, p. 186-96.
- OKUNO, S., H. Sato, K. Kuriyama-Matsumura, M. Tamba, H. Wang, S. Sohda, H. Hamada, H. Yoshikawa, T. Kondo et S. Bannai. 2003. "Role of cystine transport in intracellular glutathione level and cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines". British Journal of Cancer, vol. 88, p. 951-6.
- PALINKAS, L., G. Talaber, F. Boldizsar, D. Bartis, P. Nemeth et T. Berki. 2008. "Developmental shift in TcR-mediated rescue of thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis". Immunobiology, vol. 213, p. 39-50.
- PALIOGIANNI, F., A. Raptis, S. S. Ahuja, S. M. Najjar et D. T. Boumpas. 1993. "Negative transcriptional regulation of human interleukin 2 (IL-2) gene by glucocorticoids through interference with nuclear transcription factors AP-1 and NF-AT". Journal of Clinical Investigation, vol. 91, p. 1481-9.
- PARIHAR, A., M. S. Parihar, S. Milner et S. Bhat. 2008. "Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury". Burns, vol. 34, p. 6-17.
- PARKER, C. R. Jr et C. R. Baxter. 1985. "Divergence in adrenal steroid secretory pattern after thermal injury in adult patients". Journal of Trauma, vol. 25, p. 508-10.
- PARMACEK, M. S., B. A. Karpinski, K. M. Gottesdiener, C. B. Thompson et J. M. Leiden. 1989. "Structure, expression and regulation of the murine 4F2 heavy chain". Nucleic Acids Res, vol. 17, p. 1915-31.

PATENAUME, J., M. D'Elia, C. Hamelin, D. Garrel et J. Bernier. 2005. "Burn injury induces a change in T cell homeostasis affecting preferentially CD4+ T cells". Journal of Leukocyte Biology, vol. 77, p. 141-50.

PATSCHEK, D., K. Lodenkemper et F. Buttgerit. 2001. "Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis". Bone, vol. 29, p. 498-505.

PAZIRANDEH, A., M. Jondal et S. Okret. 2005. "Conditional expression of a glucocorticoid receptor transgene in thymocytes reveals a role for thymic-derived glucocorticoids in thymopoiesis in vivo". Endocrinology, vol. 146, p. 2501-7.

PAZIRANDEH, A., Y. Xue, T. Prestegaard, M. Jondal et S. Okret. 2002. "Effects of altered glucocorticoid sensitivity in the T cell lineage on thymocyte and T cell homeostasis". FASEB Journal, vol. 16, p. 727-9.

PAZIRANDEH, A., Y. Xue, I. Rafter, J. Sjovall, M. Jondal et S. Okret. 1999. "Paracrine glucocorticoid activity produced by mouse thymic epithelial cells". FASEB Journal, vol. 13, p. 893-901.

PELLEGRINI, J. D., A. K. De, K. Kodys, J. C. Puyana, R. K. Furse et C. Miller-Graziano. 2000. "Relationships between T lymphocyte apoptosis and anergy following trauma". Journal of Surgical Research, vol. 88, p. 200-6.

PEMBERTON, P. A., P. E. Stein, M. B. Pepys, J. M. Potter et R. W. Carrell. 1988. "Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation". Nature, vol. 336, p. 257-8.

PENIT, C. et F. Vasseur. 1997. "Expansion of mature thymocyte subsets before emigration to the periphery". Journal of Immunology, vol. 159, p. 4848-56.

PERANDONES, C. E., V. A. Illera, D. Peckham, L. L. Stunz et R. F. Ashman. 1993. "Regulation of apoptosis in vitro in mature murine spleen T cells". Journal of Immunology, vol. 151, p. 3521-9.

PERLSTEIN, R. S., M. H. Whitnall, J. S. Abrams, E. H. Mougey et R. Neta. 1993. "Synergistic roles of interleukin-6, interleukin-1, and tumor necrosis factor in the adrenocorticotropin response to bacterial lipopolysaccharide in vivo". Endocrinology, vol. 132, p. 946-52.

PETERSON, J. D., L. A. Herzenberg, K. Vasquez et C. Waltenbaugh. 1998. "Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, p. 3071-6.

PICCIRILLO, C. A. et A. M. Thornton. 2004. "Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells". Trends Immunol, vol. 25, p. 374-80.

PRUETT, S. B. et E. L. Padgett. 2004. "Thymus-derived glucocorticoids are insufficient for normal thymus homeostasis in the adult mouse". BMC Immunol, vol. 5, p. 24.

- PUGEAT, M., A. Bonnction, D. Perrot, B. Rocle-Nicolas, H. Lejeune, C. Grenot, H. Dechaud, C. Brebant, J. Motin et C. Y. Cuilleron. 1989. "Decreased immunoreactivity and binding activity of corticosteroid-binding globulin in serum in septic shock". Clinical Chemistry, vol. 35, p. 1675-9.
- PURTON, J. F., R. L. Boyd, T. J. Cole et D. I. Godfrey. 2000. "Intrathymic T cell development and selection proceeds normally in the absence of glucocorticoid receptor signaling". Immunity, vol. 13, p. 179-86.
- PURTON, J. F., Y. Zhan, D. R. Liddicoat, C. L. Hardy, A. M. Lew, T. J. Cole et D. I. Godfrey. 2002. "Glucocorticoid receptor deficient thymic and peripheral T cells develop normally in adult mice". European Journal of Immunology, vol. 32, p. 3546-55.
- REDONDO, J. M., M. Fresno et A. Lopez-Rivas. 1988. "Inhibition of interleukin 2-induced proliferation of cloned murine T cells by glucocorticoids. Possible involvement of an inhibitory protein". European Journal of Immunology, vol. 18, p. 1555-9.
- REEM, G. H. et N. H. Yeh. 1984. "Interleukin 2 regulates expression of its receptor and synthesis of gamma interferon by human T lymphocytes". Science, vol. 225, p. 429-30.
- REICHARDT, H. M., K. H. Kaestner, J. Tuckermann, O. Kretz, O. Wessely, R. Bock, P. Gass, W. Schmid, P. Herrlich, P. Angel et G. Schutz. 1998. "DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival". Cell, vol. 93, p. 531-41.
- RICHARDS, D. F., M. Fernandez, J. Caulfield et C. M. Hawrylowicz. 2000. "Glucocorticoids drive human CD8(+) T cell differentiation towards a phenotype with high IL-10 and reduced IL-4, IL-5 and IL-13 production". European Journal of Immunology, vol. 30, p. 2344-54.
- RINCON, M., H. Enslen, J. Raingeaud, M. Recht, T. Zapton, M. S. Su, L. A. Penix, R. J. Davis et R. A. Flavell. 1998. "Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway". EMBO Journal, vol. 17, p. 2817-29.
- RINCON, M. et G. Pedraza-Alva. 2003. "JNK and p38 MAP kinases in CD4+ and CD8+ T cells". Immunological Reviews, vol. 192, p. 131-42.
- RINTOUL, R. C., R. C. Buttery, A. C. Mackinnon, W. S. Wong, D. Mosher, C. Haslett et T. Sethi. 2002. "Cross-linking CD98 promotes integrin-like signaling and anchorage-independent growth". Molecular Biology of the Cell, vol. 13, p. 2841-52.
- ROBERTSON, P., T. K. Means, A. D. Luster et D. T. Scadden. 2006. "CXCR4 and CCR5 mediate homing of primitive bone marrow-derived hematopoietic cells to the postnatal thymus". Experimental Hematology, vol. 34, p. 308-19.
- ROBYR, D., A. P. Wolffe et W. Wahli. 2000. "Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks". Molecular Endocrinology, vol. 14, p. 329-47.
- ROCK, C. L., R. E. Dechert, R. Khilnani, R. S. Parker et J. L. Rodriguez. 1997. "Carotenoids and antioxidant vitamins in patients after burn injury". Journal of Burn Care and Rehabilitation, vol. 18, p. 269-78; discussion 268.

- RODRIGUEZ-MORA, O. G., C. J. Howe, M. M. Lahair, J. A. McCubrey et R. A. Franklin. 2005. "Inhibition of CREB transcriptional activity in human T lymphocytes by oxidative stress". Free Radical Biology and Medicine, vol. 38, p. 1653-61.
- ROGATSKY, I., S. K. Logan et M. J. Garabedian. 1998. "Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-Jun N-terminal kinase". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, p. 2050-5.
- ROGER, T., A. L. Chanson, M. Knaup-Reymond et T. Calandra. 2005. "Macrophage migration inhibitory factor promotes innate immune responses by suppressing glucocorticoid-induced expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1". European Journal of Immunology, vol. 35, p. 3405-13.
- RONCHETTI, S., O. Zollo, S. Bruscoli, M. Agostini, R. Bianchini, G. Nocentini, E. Ayroldi et C. Riccardi. 2004. "GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations". European Journal of Immunology, vol. 34, p. 613-22.
- ROTH, S. et W. Droege. 1991. "Regulation of interleukin 2 production, interleukin 2 mRNA expression and intracellular glutathione levels in ex vivo derived T lymphocytes by lactate". European Journal of Immunology, vol. 21, p. 1933-7.
- RUIZ, E., R. C. Siow, S. R. Bartlett, A. M. Jenner, H. Sato, S. Bannai et G. E. Mann. 2003. "Vitamin C inhibits diethylmaleate-induced L-cystine transport in human vascular smooth muscle cells". Free Radical Biology and Medicine, vol. 34, p. 103-10.
- SACEDON, R., A. Vicente, A. Varas, E. Jimenez, J. J. Munoz et A. G. Zapata. 1999. "Glucocorticoid-mediated regulation of thymic dendritic cell function". International Immunology, vol. 11, p. 1217-24.
- SAEZ, J. C., P. H. Ward, B. Gunther et E. Vivaldi. 1984. "Superoxide radical involvement in the pathogenesis of burn shock". Circulatory Shock, vol. 12, p. 229-39.
- SAITO, D., Y. Okada, T. Takahara, H. Yamashita, H. Ohno et M. Inoue. 1994. "The effect of an SOD derivative (SM-SOD) administration in a burned rat model". Tohoku Journal of Experimental Medicine, vol. 174, p. 31-40.
- SAITO, D., T. Ookawara, K. Fukuzuka, M. Kawakami, T. Sakamoto, H. Ohno et Y. Okada. 2001. "Characteristics of plasma extracellular SOD in burned patients". Burns, vol. 27, p. 577-81.
- SAKAKURA, Y., H. Sato, A. Shiiya, M. Tamba, J. Sagara, M. Matsuda, N. Okamura, N. Makino et S. Bannai. 2007. "Expression and function of cystine/glutamate transporter in neutrophils". Journal of Leukocyte Biology, vol. 81, p. 974-82.
- SAKARCAN, A., O. Sehirli, A. Velioglu-Ovunc, F. Ercan, G. Erkanl, N. Gedik et G. Sener. 2005. "Ginkgo biloba extract improves oxidative organ damage in a rat model of thermal trauma". Journal of Burn Care and Rehabilitation, vol. 26, p. 515-24.

SAKLATVALA, J. 2002. "Glucocorticoids: do we know how they work?". Arthritis Res, vol. 4, p. 146-50.

SAPOLSKY, R. M., L. M. Romero et A. U. Munck. 2000. "How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions". Endocrine Reviews, vol. 21, p. 55-89.

SATO, H., K. Fujiwara, J. Sagara et S. Bannai. 1995. "Induction of cystine transport activity in mouse peritoneal macrophages by bacterial lipopolysaccharide". Biochemical Journal, vol. 310 (Pt 2), p. 547-51.

SATO, H., K. Kuriyama-Matsumura, T. Hashimoto, H. Sasaki, H. Wang, T. Ishii, G. E. Mann et S. Bannai. 2001. "Effect of oxygen on induction of the cystine transporter by bacterial lipopolysaccharide in mouse peritoneal macrophages". Journal of Biological Chemistry, vol. 276, p. 10407-12.

SATO, H., S. Nomura, K. Maebara, K. Sato, M. Tamba et S. Bannai. 2004. "Transcriptional control of cystine/glutamate transporter gene by amino acid deprivation". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 325, p. 109-16.

SATO, H., A. Shiiya, M. Kimata, K. Maebara, M. Tamba, Y. Sakakura, N. Makino, F. Sugiyama, K. Yagami, T. Moriguchi, S. Takahashi et S. Bannai. 2005. "Redox imbalance in cystine/glutamate transporter-deficient mice". Journal of Biological Chemistry, vol. 280, p. 37423-9.

SATO, H., M. Tamba, T. Ishii et S. Bannai. 1999. "Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins". Journal of Biological Chemistry, vol. 274, p. 11455-8.

SAVINO, W. et M. Dardenne. 2000. "Neuroendocrine control of thymus physiology". Endocrine Reviews, vol. 21, p. 412-43.

SCHAFFER, M. et A. Barbul. 1998. "Lymphocyte function in wound healing and following injury". British Journal of Surgery, vol. 85, p. 444-60.

SCHMID, W., T. J. Cole, J. A. Blendy et G. Schutz. 1995. "Molecular genetic analysis of glucocorticoid signalling in development". Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, vol. 53, p. 33-5.

SCHMIDT, M., N. Lugering, A. Lugering, H. G. Pauels, K. Schulze-Osthoff, W. Domschke et T. Kucharzik. 2001. "Role of the CD95/CD95 ligand system in glucocorticoid-induced monocyte apoptosis". Journal of Immunology, vol. 166, p. 1344-51.

SCHROEDER, S., M. Wichers, D. Klingmuller, M. Hofer, L. E. Lehmann, T. von Spiegel, R. Hering, C. Putensen, A. Hoeft et F. Stuber. 2001. "The hypothalamic-pituitary-adrenal axis of patients with severe sepsis: altered response to corticotropin-releasing hormone". Critical Care Medicine, vol. 29, p. 310-6.

- SCHWACHA, M. G. 2003. "Macrophages and post-burn immune dysfunction". Burns, vol. 29, p. 1-14.
- SCHWACHA, M. G., A. Ayala, W. G. Cioffi, K. I. Bland et I. H. Chaudry. 1999. "Role of protein kinase C in cyclic AMP-mediated suppression of T-lymphocyte activation following burn injury". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1455, p. 45-53.
- SECKL, J. R. et B. R. Walker. 2001. "Minireview: 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action". Endocrinology, vol. 142, p. 1371-6.
- SEKKAT, C., J. Dornand et M. Gerber. 1988. "Oxidative phenomena are implicated in human T-cell stimulation". Immunology, vol. 63, p. 431-7.
- SENER, G., H. Satyroglu, A. Ozer Sehirli et A. Kacmaz. 2003. "Protective effect of aqueous garlic extract against oxidative organ damage in a rat model of thermal injury". Life Sciences, vol. 73, p. 81-91.
- SENER, G., A. O. Sehirli, H. Satiroglu, M. Keyer-Uysal et B. C. Yege. 2002. "Melatonin improves oxidative organ damage in a rat model of thermal injury". Burns, vol. 28, p. 419-25.
- SENER, G., A. O. Sehirli, H. Satiroglu, M. Keyer-Uysal et B. C. Yegen. 2002. "Melatonin prevents oxidative kidney damage in a rat model of thermal injury". Life Sciences, vol. 70, p. 2977-85.
- SEVALJEVIC, L., M. Petrovic, D. Bogojevic, J. Savic et D. Pantelic. 1989. "Acute-phase response to scalding: changes in serum properties and acute-phase protein concentrations". Circulatory Shock, vol. 28, p. 293-307.
- SHAN, Z., D. Tan, J. Satriano, S. Silbiger et D. Schlondorff. 1994. "Intracellular glutathione influences collagen generation by mesangial cells". Kidney International, vol. 46, p. 388-95.
- SHINKAI, Y., S. Koyasu, K. Nakayama, K. M. Murphy, D. Y. Loh, E. L. Reinherz et F. W. Alt. 1993. "Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes". Science, vol. 259, p. 822-5.
- SOLIS-COHEN, S. 1990. "The use of adrenal substance in the treatment of asthma. 1900". Journal of Asthma, vol. 27, p. 401-406; discussion 399.
- SPAHN, J. D., S. J. Szeffler, W. Surs, D. E. Doherty, S. R. Nimmagadda et D. Y. Leung. 1996. "A novel action of IL-13: induction of diminished monocyte glucocorticoid receptor-binding affinity". Journal of Immunology, vol. 157, p. 2654-9.
- SPENCER, R. L., A. H. Miller, H. Moday, M. Stein et B. S. McEwen. 1993. "Diurnal differences in basal and acute stress levels of type I and type II adrenal steroid receptor activation in neural and immune tissues". Endocrinology, vol. 133, p. 1941-50.
- STRICKLAND, I., K. Kisich, P. J. Hauk, A. Vottero, G. P. Chrousos, D. J. Klemm et D. Y. Leung. 2001. "High constitutive glucocorticoid receptor beta in human neutrophils enables them

to reduce their spontaneous rate of cell death in response to corticosteroids". Journal of Experimental Medicine, vol. 193, p. 585-93.

SUDA, T., R. Murray, C. Guidos et A. Zlotnik. 1990. "Growth-promoting activity of IL-1 alpha, IL-6, and tumor necrosis factor-alpha in combination with IL-2, IL-4, or IL-7 on murine thymocytes. Differential effects on CD4/CD8 subsets and on CD3+/CD3- double-negative thymocytes". Journal of Immunology, vol. 144, p. 3039-45.

SUGAMA, K., Y. Namba, M. Hatanaka et M. Hanaoka. 1987. "2-Mercaptoethanol acts at the restricted stage of interleukin-2 dependent lymphocyte proliferation". Journal of Cellular Physiology, vol. 131, p. 23-8.

SUN, K. et L. Myatt. 2003. "Enhancement of glucocorticoid-induced 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression by proinflammatory cytokines in cultured human amnion fibroblasts". Endocrinology, vol. 144, p. 5568-77.

SUTHANTHIRAN, M., M. E. Anderson, V. K. Sharma et A. Meister. 1990. "Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via the CD2 and CD3 antigens". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 87, p. 3343-7.

SWARTZ, S. L. et R. G. Dluhy. 1978. "Corticosteroids: clinical pharmacology and therapeutic use". Drugs, vol. 16, p. 238-55.

SZATMARY, Z., M. J. Garabedian et J. Vilcek. 2004. "Inhibition of glucocorticoid receptor-mediated transcriptional activation by p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase". Journal of Biological Chemistry, vol. 279, p. 43708-15.

TAGUCHI, K., M. Tamba, S. Bannai et H. Sato. 2007. "Induction of cystine/glutamate transporter in bacterial lipopolysaccharide induced endotoxemia in mice". J Inflamm (Lond), vol. 4, p. 20.

TAN, Y. L., S. L. Wang et Y. L. Dong. 2003. "[The isolation and purification of 19S regulator compound and the change of its protein level in rat skeletal muscle after severe scalding]". Zhonghua Shao Shang Za Zhi, vol. 19, p. 25-8.

TARCIC, N., H. Ovadia, D. W. Weiss et J. Weidenfeld. 1998. "Restraint stress-induced thymic involution and cell apoptosis are dependent on endogenous glucocorticoids". Journal of Neuroimmunology, vol. 82, p. 40-6.

TATLA, S., V. Woodhead, J. C. Foreman et B. M. Chain. 1999. "The role of reactive oxygen species in triggering proliferation and IL-2 secretion in T cells". Free Radical Biology and Medicine, vol. 26, p. 14-24.

TAYLOR, M. J., R. A. Smart et R. P. Sharma. 1989. "Relationship of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis with chemically induced immunomodulation. I. Stress-like response after exposure to T-2 toxin". Toxicology, vol. 56, p. 179-95.

TEODORCZYK-INJEFAN, J. A., M. Cembrzynska-Nowak, S. Lalani, W. J. Peters et G. B. Mills. 1995. "Immune deficiency following thermal trauma is associated with apoptotic cell death". Journal of Clinical Immunology, vol. 15, p. 318-28.

TEODORCZYK-INJEFAN, J. A., B. G. Sparkes, G. B. Mills et W. J. Peters. 1991. "Immunosuppression follows systemic T lymphocyte activation in the burn patient". Clinical and Experimental Immunology, vol. 85, p. 515-8.

TEODORCZYK-INJEFAN, J. A., B. G. Sparkes, G. B. Mills et W. J. Peters. 1991. "Soluble interleukin 2-receptor alpha secretion is related to altered interleukin 2 production in thermally injured patients". Burns, vol. 17, p. 290-5.

TEODORCZYK-INJEFAN, J. A., B. G. Sparkes, G. B. Mills, W. J. Peters et R. E. Falk. 1986. "Impairment of T cell activation in burn patients: a possible mechanism of thermal injury-induced immunosuppression". Clinical and Experimental Immunology, vol. 65, p. 570-81.

THIERINGER, R., C. B. Le Grand, L. Carbin, T. Q. Cai, B. Wong, S. D. Wright et A. Hermanowski-Vosatka. 2001. "11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is induced in human monocytes upon differentiation to macrophages". Journal of Immunology, vol. 167, p. 30-5.

THOMPSON, A., V. K. Han et K. Yang. 2004. "Differential expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 mRNA and glucocorticoid receptor protein during mouse embryonic development". Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, vol. 88, p. 367-75.

THOMSON, P. D., G. O. Till, J. O. Woolliscroft, D. J. Smith et J. K. Prasad. 1990. "Superoxide dismutase prevents lipid peroxidation in burned patients". Burns, vol. 16, p. 406-8.

TIAN, L., H. G. Knaus et M. J. Shipston. 1998. "Glucocorticoid regulation of calcium-activated potassium channels mediated by serine/threonine protein phosphatase". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 13531-6.

TILL, G. O., J. R. Hatherill, W. W. Tourtellotte, M. J. Lutz et P. A. Ward. 1985. "Lipid peroxidation and acute lung injury after thermal trauma to skin. Evidence of a role for hydroxyl radical". American Journal of Pathology, vol. 119, p. 376-84.

TLIBA, O., J. A. Cidlowski et Y. Amrani. 2006. "CD38 expression is insensitive to steroid action in cells treated with tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by a mechanism involving the up-regulation of the glucocorticoid receptor beta isoform". Molecular Pharmacology, vol. 69, p. 588-96.

TOH, M. L., Y. Yang, M. Leech, L. Santos et E. F. Morand. 2004. "Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1, a negative regulator of the mitogen-activated protein kinases, in rheumatoid arthritis: up-regulation by interleukin-1beta and glucocorticoids". Arthritis and Rheumatism, vol. 50, p. 3118-28.

TOMLINSON, J. W., J. Moore, M. S. Cooper, I. Bujalska, M. Shahmanesh, C. Burt, A. Strain, M. Hewison et P. M. Stewart. 2001. "Regulation of expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue: tissue-specific induction by cytokines". Endocrinology, vol. 142, p. 1982-9.

TORRENTS, D., R. Estevez, M. Pineda, E. Fernandez, J. Lloberas, Y. B. Shi, A. Zorzano et M. Palacin. 1998. "Identification and characterization of a membrane protein ( $\gamma$ +L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity  $\gamma$ +L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance". Journal of Biological Chemistry, vol. 273, p. 32437-45.

TOWERS, R., T. Naftali, G. Gabay, M. Carlebach, A. Klein et B. Novis. 2005. "High levels of glucocorticoid receptors in patients with active Crohn's disease may predict steroid resistance". Clinical and Experimental Immunology, vol. 141, p. 357-62.

TREDGET, E. E. et Y. M. Yu. 1992. "The metabolic effects of thermal injury". World Journal of Surgery, vol. 16, p. 68-79.

TSITOURA, D. C. et P. B. Rothman. 2004. "Enhancement of MEK/ERK signaling promotes glucocorticoid resistance in CD4+ T cells". Journal of Clinical Investigation, vol. 113, p. 619-27.

TURNBULL, A. V. et C. Rivier. 1997. "Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides". Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, vol. 215, p. 1-10.

TURNBULL, A. V. et C. L. Rivier. 1999. "Sprague-Dawley rats obtained from different vendors exhibit distinct adrenocorticotropin responses to inflammatory stimuli". Neuroendocrinology, vol. 70, p. 186-95.

UTSUNOMIYA, T., M. Kobayashi, D. N. Herndon, R. B. Pollard et F. Suzuki. 2001. "A mechanism of interleukin-12 unresponsiveness associated with thermal injury". Journal of Surgical Research, vol. 96, p. 211-7.

VACCA, A., M. P. Felli, A. R. Farina, S. Martinotti, M. Maroder, I. Scarpanti, D. Meco, E. Petrangeli, L. Frati et A. Gulino. 1992. "Glucocorticoid receptor-mediated suppression of the interleukin 2 gene expression through impairment of the cooperativity between nuclear factor of activated T cells and AP-1 enhancer elements". Journal of Experimental Medicine, vol. 175, p. 637-46.

VACCHIO, M. S. et J. D. Ashwell. 2000. "Glucocorticoids and thymocyte development". Seminars in Immunology, vol. 12, p. 475-85.

VACCHIO, M. S. et J. D. Ashwell. 1997. "Thymus-derived glucocorticoids regulate antigen-specific positive selection". Journal of Experimental Medicine, vol. 185, p. 2033-8.

VACCHIO, M. S., J. Y. Lee et J. D. Ashwell. 1999. "Thymus-derived glucocorticoids set the thresholds for thymocyte selection by inhibiting TCR-mediated thymocyte activation". Journal of Immunology, vol. 163, p. 1327-33.

- VACCHIO, M. S., V. Papadopoulos et J. D. Ashwell. 1994. "Steroid production in the thymus: implications for thymocyte selection". Journal of Experimental Medicine, vol. 179, p. 1835-46.
- VALENTI, L. M., J. Mathieu, Y. Chancerelle, M. De Sousa, M. Levacher, A. T. Dinh-Xuan et I. Florentin. 2005. "High levels of endogenous nitric oxide produced after burn injury in rats arrest activated T lymphocytes in the first G1 phase of the cell cycle and then induce their apoptosis". Experimental Cell Research, vol. 306, p. 150-67.
- VAN DEN BRANDT, J., D. Wang et H. M. Reichardt. 2004. "Resistance of single-positive thymocytes to glucocorticoid-induced apoptosis is mediated by CD28 signaling". Molecular Endocrinology, vol. 18, p. 687-95.
- VAN LAETHEM, F., E. Baus, L. A. Smyth, F. Andris, F. Bex, J. Urbain, D. Kioussis et O. Leo. 2001. "Glucocorticoids attenuate T cell receptor signaling". Journal of Experimental Medicine, vol. 193, p. 803-14.
- VAN LAETHEM, F., X. Liang, F. Andris, J. Urbain, M. Vandenbranden, J. M. Ruysschaert, M. D. Resh, T. M. Stulnig et O. Leo. 2003. "Glucocorticoids alter the lipid and protein composition of membrane rafts of a murine T cell hybridoma". Journal of Immunology, vol. 170, p. 2932-9.
- VAUGHAN, G. M., R. A. Becker, J. P. Allen, C. W. Goodwin Jr, B. A. Pruitt Jr et A. D. Mason Jr. 1982. "Cortisol and corticotrophin in burned patients". Journal of Trauma, vol. 22, p. 263-73.
- VEIOPOLLOU, C., O. Kogopoulou, E. Tzakos, G. Mavrothalassitis, D. Mitsias, A. Karafoulidou, F. Paliogianni, H. M. Moutsopoulos et G. Thyphronitis. 2004. "IL-2 and IL-10 production by human CD4+T cells is differentially regulated by p38: mode of stimulation-dependent regulation of IL-2". Neuroimmunomodulation, vol. 11, p. 199-208.
- VERHASSELT, V., W. Vanden Berghe, N. Vanderheyde, F. Willemans, G. Haegeman et M. Goldman. 1999. "N-acetyl-L-cysteine inhibits primary human T cell responses at the dendritic cell level: association with NF-kappaB inhibition". Journal of Immunology, vol. 162, p. 2569-74.
- VERHOEVEN, G. T., J. M. Van Haarst, H. J. De Wit, P. J. Simons, H. C. Hoogsteden et H. A. Drexhage. 2000. "Glucocorticoids hamper the ex vivo maturation of lung dendritic cells from their low autofluorescent precursors in the human bronchoalveolar lavage: decreases in allostimulatory capacity and expression of CD80 and CD86". Clinical and Experimental Immunology, vol. 122, p. 232-40.
- WADA, K., T. Kina, H. Kawamoto, M. Kondo et Y. Katsura. 1996. "Requirement of cell interactions through adhesion molecules in the early phase of T cell development". Cellular Immunology, vol. 170, p. 11-9.
- WAGNER, D. H. Jr, J. Hagman, P. S. Linsley, W. Hodsdon, J. H. Freed et M. K. Newell. 1996. "Rescue of thymocytes from glucocorticoid-induced cell death mediated by CD28/CTLA-4 costimulatory interactions with B7-1/B7-2". Journal of Experimental Medicine, vol. 184, p. 1631-8.

- WAGNER, J. G. et R. A. Roth. 1999. "Neutrophil migration during endotoxemia". Journal of Leukocyte Biology, vol. 66, p. 10-24.
- WALKER, K. B., J. M. Potter et A. K. House. 1987. "Interleukin 2 synthesis in the presence of steroids: a model of steroid resistance". Clinical and Experimental Immunology, vol. 68, p. 162-7.
- WANG, Z., J. Frederick et M. J. Garabedian. 2002. "Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo". Journal of Biological Chemistry, vol. 277, p. 26573-80.
- WARREN, A. P., K. Patel, Y. Miyamoto, J. N. Wygant, D. G. Woodside et B. W. McIntyre. 2000. "Convergence between CD98 and integrin-mediated T-lymphocyte co-stimulation". Immunology, vol. 99, p. 62-8.
- WATANABE, H. et S. Bannai. 1987. "Induction of cystine transport activity in mouse peritoneal macrophages". Journal of Experimental Medicine, vol. 165, p. 628-40.
- WEBSTER, J. C., C. M. Jewell, J. E. Bodwell, A. Munck, M. Sar et J. A. Cidlowski. 1997. "Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein". Journal of Biological Chemistry, vol. 272, p. 9287-93.
- WEBSTER, J. C., R. H. Oakley, C. M. Jewell et J. A. Cidlowski. 2001. "Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 98, p. 6865-70.
- WEBSTER, J. I., L. Tonelli et E. M. Sternberg. 2002. "Neuroendocrine regulation of immunity". Annual Review of Immunology, vol. 20, p. 125-63.
- WENG, C. F., W. Zhao, K. V. Fegeding, J. L. Komisar et J. Tseng. 1999. "Resistance of Staphylococcal enterotoxin B- induced proliferation and apoptosis to the effects of dexamethasone in mouse lymphocyte cultures". International Immunology, vol. 11, p. 787-801.
- WERLEN, G., B. Hausmann, D. Naehler et E. Palmer. 2003. "Signaling life and death in the thymus: timing is everything". Science, vol. 299, p. 1859-63.
- WIEGERS, G. J., M. S. Labey, I. E. Stec, W. E. Klinkert, F. Holsboer et J. M. Reul. 1995. "Glucocorticoids accelerate anti-T cell receptor-induced T cell growth". Journal of Immunology, vol. 155, p. 1893-902.
- WIEGERS, G. J., I. E. Stec, W. E. Klinkert, A. C. Linthorst et J. M. Reul. 2001. "Bidirectional effects of corticosterone on splenic T-cell activation: critical role of cell density and culture time". Neuroendocrinology, vol. 73, p. 139-48.
- WIEGERS, G. J., I. E. Stec, W. E. Klinkert et J. M. Reul. 2000. "Glucocorticoids regulate TCR-induced elevation of CD4: functional implications". Journal of Immunology, vol. 164, p. 6213-20.

- WILKINSON, B., J. J. Owen et E. J. Jenkinson. 1999. "Factors regulating stem cell recruitment to the fetal thymus". Journal of Immunology, vol. 162, p. 3873-81.
- WILLIAMS, M. S. et P. A. Henkart. 1996. "Role of reactive oxygen intermediates in TCR-induced death of T cell blasts and hybridomas". Journal of Immunology, vol. 157, p. 2395-402.
- WOLFE, R. R., F. Jahoor et W. H. Hartl. 1989. "Protein and amino acid metabolism after injury". Diabetes/Metabolism Reviews, vol. 5, p. 149-64.
- WOODSIDE, K. J., M. Spies, X. W. Wu, J. Song, S. S. Quadeer, J. A. Daller et S. E. Wolf. 2003. "Decreased lymphocyte apoptosis by anti-tumor necrosis factor antibody in Peyer's patches after severe burn". Shock, vol. 20, p. 70-3.
- WOOLF, P.D. 1992. "Hormonal responses to trauma". Critical Care Medicine, vol. 20, p. 216-26.
- WU, C. Y., M. Sarfati, C. Heusser, S. Fournier, M. Rubio-Trujillo, R. Peleman et G. Delespesse. 1991. "Glucocorticoids increase the synthesis of immunoglobulin E by interleukin 4-stimulated human lymphocytes". Journal of Clinical Investigation, vol. 87, p. 870-7.
- XIA, M., J. Gasser et U. Feige. 1999. "Dexamethasone enhances CTLA-4 expression during T cell activation". Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 55, p. 1649-56.
- XU, Q., D. Y. Leung et K. O. Kisich. 2003. "Serine-arginine-rich protein p30 directs alternative splicing of glucocorticoid receptor pre-mRNA to glucocorticoid receptor beta in neutrophils". Journal of Biological Chemistry, vol. 278, p. 27112-8.
- XUE, Y., M. Murdjeva, S. Okret, D. McConkey, D. Kioussis et M. Jondal. 1996. "Inhibition of I-Ad-, but not Db-restricted peptide-induced thymic apoptosis by glucocorticoid receptor antagonist RU486 in T cell receptor transgenic mice". European Journal of Immunology, vol. 26, p. 428-34.
- YAGITA, H. et Y. Hashimoto. 1986. "Monoclonal antibodies that inhibit activation and proliferation of lymphocytes. II. Requisite role of the monoclonal antibody-defined antigen systems in activation and proliferation of human and rat lymphocytes". Journal of Immunology, vol. 136, p. 2062-8.
- YAGITA, H., T. Masuko, N. Takahashi et Y. Hashimoto. 1986. "Monoclonal antibodies that inhibit activation and proliferation of lymphocytes. I. Expression of the antigen on monocytes and activated lymphocytes". Journal of Immunology, vol. 136, p. 2055-61.
- YANG, L. et B. Hsu. 1992. "The roles of macrophage (M phi) and PGE-2 in postburn immunosuppression". Burns, vol. 18, p. 132-6.
- YONG, P. Y., C. Harlow, K. J. Thong et S. G. Hillier. 2002. "Regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene expression in human ovarian surface epithelial cells by interleukin-1". Human Reproduction, vol. 17, p. 2300-6.

- YOUNG, E. A., S. P. Kwak et J. Kottak. 1995. "Negative feedback regulation following administration of chronic exogenous corticosterone". Journal of Neuroendocrinology, vol. 7, p. 37-45.
- YUDT, M. R. et J. A. Cidlowski. 2002. "The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene". Molecular Endocrinology, vol. 16, p. 1719-26.
- ZACHARCHUK, C. M., M. Mercep, P. K. Chakraborti, S. S. Simons Jr et J. D. Ashwell. 1990. "Programmed T lymphocyte death. Cell activation- and steroid-induced pathways are mutually antagonistic". Journal of Immunology, vol. 145, p. 4037-45.
- ZEDLER, S., R. C. Bone, A. E. Baue, G. H. von Donnersmarck et E. Faist. 1999. "T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns". Critical Care Medicine, vol. 27, p. 66-72.
- ZHANG, T. Y. et R. A. Daynes. 2007. "Macrophages from 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-deficient mice exhibit an increased sensitivity to lipopolysaccharide stimulation due to TGF-beta-mediated up-regulation of SHIP1 expression". Journal of Immunology, vol. 179, p. 6325-35.
- ZHANG, T. Y., X. Ding et R. A. Daynes. 2005. "The expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I by lymphocytes provides a novel means for intracrine regulation of glucocorticoid activities". Journal of Immunology, vol. 174, p. 879-89.
- ZILBERMAN, Y., E. Yefenof, E. Oron, A. Dorogin et R. Guy. 1996. "T cell receptor-independent apoptosis of thymocyte clones induced by a thymic epithelial cell line is mediated by steroids". Cellular Immunology, vol. 170, p. 78-84.
- ZILBERMAN, Y., E. Zafrir, H. Ovadia, E. Yefenof, R. Guy et R. V. Sionov. 2004. "The glucocorticoid receptor mediates the thymic epithelial cell-induced apoptosis of CD4+8+ thymic lymphoma cells". Cellular Immunology, vol. 227, p. 12-23.
- ZUBIAGA, A. M., E. Munoz et B. T. Huber. 1992. "IL-4 and IL-2 selectively rescue Th cell subsets from glucocorticoid-induced apoptosis". Journal of Immunology, vol. 149, p. 107-12.