Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

RÔLE DE LA TRANSCORTINE DANS LA RÉGULATION DE LA BIODISPONIBILITÉ DES GLUCOCORTICOÏDES À LA SUITE D'UNE BRÛLURE SÉVÈRE : CONSÉQUENCES POUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE

Par
Michele D'Elia

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

Jury d'évaluation

Président du Jury et examinateur interne	Daniel G. Cyr INRS-Institut Armand-Frappier
Examinateur externe	Dominique R. Garrel CHUM Hôtel-Dieu de Montréal Centre des Grands-brûlés
Directeur de recherche	Jacques Bernier INRS-Institut Armand-Frappier

© droits réservés de *Michele D'Elia* 2002

Remerciements

Je voudrais en premier lieu, remercier mon directeur de recherche, le docteur Jacques Bernier, pour son imagination, son éternel optimisme et son support constant durant mes deux années de maîtrise passées dans son laboratoire. C'est grâce à lui que j'ai su développer mon intérêt pour la recherche scientifique. Le projet sur lequel j'ai eu l'opportunité de travailler s'est avéré une source de défis qui m'auront sans cesse poussé à aller plus loin. C'est à travers la passion qu'il m'a transmise que j'ai décidé de poursuivre mes études graduées au niveau du doctorat dans son laboratoire.

En second lieu, un merci aux gens avec qui j'ai eu l'opportunité de travailler en laboratoire depuis maintenant 2 ans. Claudine Hamelin la technicienne, cette travailleuse dévouée à l'âme charitable qui, avec sa bonne humeur, a su égayer mes journées. Julie Champoux et Myrian Colombo, mes collègues de laboratoire qui m'ont accueilli à mes débuts et m'ont guidé dans mon apprentissage.

Un merci particulier à Julie Patenaude avec qui j'ai eu de plaisir de collaborer en de nombreuses occasions et qui a toujours su donner une direction à nos expériences. Ton sens de l'organisation a déteint sur moi et ton aide précieuse fut grandement appréciée.

Merci à la Fondation Armand-Frappier qui a subventionné mes études au niveau maîtrise par l'entremise d'une bourse qui me fut accordée.

Finalement, merci à tous ceux qui de près ou de loin ont fait naître en moi cette qualité merveilleuse qu'est la curiosité et qui m'ont fait réaliser tout ce qu'on peut accomplir lorsqu'on est poussé à aller au bout de ses convictions.

Table des matières

Remerciements.....iii

Liste des abréviations.....viii

Liste des figures.....ix

Résumé.....xi

Introduction.....1

Première partie

1. Réponse hormonale de l'organisme au stress causé par un traumatisme sévère.....5

1.1 L'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien.....6
1.1.1 Fonctionnement de l'axe : physiologie.....7
1.1.2 Rôle des GC dans l'organisme.....8
1.1.3 Régulation de l'axe HPA lors d'un stress.....9
1.1.3.1 Rôle des GC.....9
1.1.3.2 Rôle des cytokines.....10
1.1.3.3 Rôle du transport hormonal.....11

2. La transcortine.....12

2.1 Propriétés générales.....12
2.2 Le gène de la CBG.....13
2.2.1 Régulation de l'expression du gène.....14
2.2.1.1 Effets de l'axe HPA sur la transcription du gène.....15
2.2.1.2 Effets de l'interleukine-6 sur la transcription du gène.....16
2.3 Synthèse de la CBG.....17
2.3.1 Modification post-traductionnelle : la N-glycosylation.....18
2.3.2.1 Les sites de glycosylation : localisation et rôle.....19
2.3.2 Modulation de la synthèse.....21
2.4 Rôle de transporteur du Cort.....21
2.4.1 Pharmacocinétique de liaison entre la CBG et le Cort.....22
2.4.2 Clivage de la protéine.....23
2.4.3 Pathologies associées à une diminution de l'activité de la CBG.....25

3. *Interactions entre les GC et le système immunitaire*.....26

3.1 Le récepteur à glucocorticoïdes (GR).....27
3.1.1 Le complexe cytoplasmique du GR.....28
3.1.2 Le complexe transcriptionnel du GR.....29

3.1.3 Mécanismes d'action des GC au niveau transcriptionnel..... 30
3.1.4 La résistance aux GC : forme β du récepteur.....32
3.2 Effets des GC sur les effecteurs de l'immunité.....33
3.2.1 Monocytes et macrophages..... 34
3.2.2 Granulocytes.....35
3.3 Effets des GC sur les cellules T..... 36
3.3.1 Maturation des thymocytes..... 36
3.3.2 Rôle des GC dans la thymus.....41
3.3.2.1 Production de GC dans le thymus..... 42
3.3.2.2 Mécanisme d'action des GC sur la maturation des thymocytes.. 43
3.4 Effets des GC sur les cellules T matures.....44
3.4.1 Différentiation des cellules T $CD4^+$ en Th1 vs Th2.....44

4. Réponse de l'organisme au stress de la brûlure.....46

4.1 Physiologie de la brûlure.....46
4.1.1 Changements au niveau endocrinien.....48
4.1.2 La réponse du système immunitaire..... 49
4.2 Influence des opiacés sur la réponse immunitaire et la régulation des GC..... 50
4.2.1 Opiacés et système immunitaire.....51
4.2.2 Opiacés et axe hypotalamo-hypophysaire surrénalien..... 53
4.2.3 Régulation de la CBG par la morphine..... 54
4.3 La buprénorphine : une alternative à la morphine.....54
4.3.1 Effets de la buprénorphine sur la réponse neuro-endocrinienne au stress..... 55
4.3.2 Effets de la buprénorphine sur la réponse immunitaire.....56

Seconde partie

1. Article # 1 : No detrimental effects from chronic exposure to buprenorphine on Corticosteroid-Binding Globulin and cortico-sensitive immune parameters

1.1 Résumé français de l'article # 1.....59
1.2 Article # 1.....61

2. Article # 2 : Free corticosterone associated with the decrease of corticosteroid binding globulin in mice after burn injury correlate with thymus atrophy

2.1 Résumé français de l'article # 2.....95
2.2 Article # 2.....97

Troisième partie

Discussion/Conclusion.....142
Bibliographie.....148

Liste des abréviations

11β-HSD	11-beta hydroxysteroid deshydrogenase
A1-P1	Alpha-1 inhibiteur de protéases
Ac	Anticorps
ACTH	Hormone Adréno-corticotropin
AMP	Adenosine mono-phosphate
AMPc	Adenosine mono-phosphate cyclique
AR	Récepteur aux androgènes
ATF-2	Facteur de transcription activé-2
Bup	Buprenorphine
CBG	Corticosteroid Binding Globulin
CBP	Protéine de liaison à CREB
C/EBP	CAAT/enhancer-binding protein
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
Con-A	Concanavalin-A
Cort	Corticosterone
CP-2	CCAAT-binding protein-2
CRF	Facteur de relâchement du corticotropin
CRH	Hormone corticotropin
DBP	Protéine de liaison au site-D
DN	Cellule double-négative
DP	Cellule double-positive
E_2	Estradiol
EGR	Facteur de croissance primaire
GC	Glucocorticoïde
G-CSF	Facteur de stimulation de colonies de granulocytes
GR	Récepteur aux glucocorticoïdes
GRE	Élément de réponse aux glucocorticoïdes
HAT	Histone acetyl-transferase
HBP	Protéine de liaison hépatique
HNF1	Facteur nucléaire hépatique-1
HPA	Hypothalamo-hypophysaire-surrénalien
Hop	HSP enhancer protein
HSP	Protéine de choc thermique
ICE-1	Enzyme de conversion de l'Il-1
ICV	Intra-cérébro-ventriculaire
IFN-γ	Interféron-gamma
IL-	Interleukine
JNK	c-Jun NH2-terminal kinase
Ka	Constante d'association
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen activated protein kinase
M-CSF	Facteur stimulant les colonies de macrophages
MIP	Protéine inflammatoire de macrophage
MR	Récepteur aux mineralocorticoïdes
NF-1IL6	Nuclear factor-1 interleukine-6
NK	Cellule « natural killer »
NLS	Signal de localisation nucléaire
NPC	Protéine du pore nucléaire
PAG	Substance grise péri-épendymaire
PARP	Poly (ADP-ribose) Polymerase
PBMC	Cellule mononucléée périphérique du sang
PKA	Protéine kinase A
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PMN	Cellule polymorphonucléaire
POMC	Proopiomelanocortin
RIA	Radio-Immuno Assay
SDF-1	Facteur dérivé du stroma
SERPIN	Protéine inhibitrice des sérines protéases
SNC	Système nerveux central
SNS	Système nerveux sympathique
TARC	Chemokines relatives à l'activation dans le thymus
TECK	Chemokines relatives à l'expression dans le thymus
TBG	Thyroxine Binding Globulin
TcR	Récepteur des cellules T
TGF-β	Facteur de croissance des tumeurs beta
TNF-α	Facteur nécrosant des tumeurs-alpha

Liste des figures et des tableaux

Liste des figures

Figure 1 : L'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien (HPA)..... 6
Figure 2 : Gène humain de la CBG composé de 5 exons et de son Promoteur..... 14
Figure 3 : Schéma général du processus de la N-glycolysation..... 19
Figure 4 : Emplacement des sites de glycosylation de la CBG..... 19
Figure 5 : Le transport du Cort aux sites inflammatoires..... 24
Figure 6 : Différentes formes de la CBG..... 25
Figure 7 : Le complexe du GR lié à l'ADN..... 30
Figure 8 : Inhibition de l'activité transcriptionnelle de NF-κB par l'induction de I-κB 32
Figure 9 : Voies enzymatiques de la synthèse des stéroïdes..... 38
Figure 10 : Structure du thymus..... 42
Figure 11 : Structure chimique de la buprénorphine..... 54

Liste des tableaux

Tableau 1 : Description des différents effets causés par les GC sur les principaux effecteurs de l'immunité 34
Tableau 2 : Description des différents effets causés par la morphine sur les principaux effecteurs de l'immunité..... 51

Résumé

Les brûlures sévères engendrent des changements importants au niveau des systèmes endocrinien et immunitaire. Les patients gravement brûlés montrent une réponse immunitaire réduite causée notamment par la baisse du nombre et de l'activité des cellules T. De plus, des niveaux élevés de cortisol (Cort) total dans la circulation résultant de l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien (HPA) sont mesurés chez ces derniers. Le Cort est la plus importante et le plus abondante hormone de stress. Le contrôle de son activité biologique est assuré par la transcortine ou corticosteroid-binding globulin (CBG) qui séquestre l'hormone et y effectue son transport dans la circulation. Peu d'études se sont intéressées à montrer comment la brûlure agit sur les niveaux de CBG et affecte ainsi le contrôle de la fraction libre de l'hormone. Seul le cort libre est biologiquement actif. Outre son importance dans la réponse associée au stress, le Cort possède une forte activité immunomodulatrice. Lors d'une brûlure sévère la relation entre les changements observés au niveau de la production et du transport des hormones de stress et les perturbations du système immunitaire sont peu connus.

Notre premier objectif fut de démontrer comment la brûlure sévère régulait la biodisponibilité du Cort, donc les effets de l'hormone sur le système immunitaire. Nous avons caractérisé les niveaux plasmatiques de Cort et de CBG et déterminé l'effet de la brûlure sur les populations du thymus. L'une des considérations importantes à la suite d'un stress est la gestion de la douleur par l'utilisation des opiacés. En effet, certaines de ces drogues peuvent perturber l'activité des systèmes endocrinien et immunitaire. L'un des objectifs de notre étude a donc été de déterminer l'effet de la buprénorphine (Bup), une drogue agoniste à la morphine employée dans le contrôle de la douleur, sur l'activité de l'axe HPA. Cette étude était nécessaire pour nous permettre de discriminer l'effet de la drogue de celui de la brûlure sévère.

Afin de répondre à ces objectifs, nous avons utilisé le modèle murin de la brûlure couvrant 20% de la surface totale du coprs de l'animal (TBSA). L'opiacé fut administré aux souris via une minipompe osmotique placée au niveau de l'abdomen. Nous avons

étudié à différents temps suivant la brûlure les changements au niveau de la CBG et de la forme du Cort. Parallèlement une analyse du statut du système immunitaire a été effectuée. Ainsi, nos expériences ont permis d'établir les cinétiques relatives à la réponse endocrinienne et immunitaire suivant la brûlure et ce, pour une période allant du jour 0 au jour 10. Pour chacun des temps, nous avons mesuré les paramètres suivants: le Cort total, le Cort libre, la capacité de liaison de la CBG, les niveaux plasmatiques de cette protéine ainsi que l'expression de son gène dans la foie. Parallèlement, nous nous sommes intéressés à caractériser les populations du thymus en évaluant par phénotypage, le niveau de maturité et l'importance relative des sous-populations lymphocytaires.

Nos travaux nous ont permis de conclure que la Bup affectait faiblement l'activité de l'axe HPA sans causer de changements au niveau du sytème immunitaire. Donc, l'emploi de cet analgésique, dans la contexte de la brûlure sévère, ne posait aucun problème puisque son effet était négligeable sur les paramètres que nous voulions tester. Ceci suggère l'utilisation préférentielle de cette drogue dans le traitement de la douleur chez des patients gravement brûlés. Par ailleurs, nos travaux ont permis d'affirmer que les niveaux de Cort libre mesurés après une brûlure sévère étaient contrôlés conjointement, par une hausse de la production de l'hormone ainsi que par une baisse de son transporteur spécifique, la CBG. Nos résultats démontrent une diminution marquée de l'expression du gène de la CBG dans le foie se soldant par le déclin de la production de cette protéine et une baisse significative de sa concentration dans le sérum. Ceci eut pour effet de réduire le nombre de sites de liaison disponibles dans le sang pour transporter le Cort, d'où une augmentation de la fraction libre, biologiquement active de l'hormone. Conséquemment, une atrophie thymique reliée exclusivement à la diminution des cellules T immatures cortico-sensibles fut observée.

Nos résultats ont permis de mieux comprendre la régulation qu'exerce la CBG sur la biodisponibilité des hormones de stress et donc, de mieux cibler leurs effets sur le système immunitaire, principalement sur les cellules cortico-sensibles du thymus.

Michele Bélie

Étudiant

Directeur de recherche

Introduction

Le Cort est un composé stéroïdien essentiel au bon fonctionnement de l'organisme puisqu'il exerce un rôle dans la régulation de la pression sanguine et du rythme cardiaque. En outre, il assure un contrôle de la glycémie en agissant comme antagoniste de l'insuline soit en favorisant la gluconéogénèse, c'est-à-dire, la production de sucre nouvellement synthétisé à partir du catabolisme des graisses et protéines. Le Cort régule l'utilisation des protéines, des graisses et des carbohydrates par les cellules de l'organisme. Par ailleurs, il existe une forte relation entre les GC et le système immunitaire. Le Cort exerce une double action sur différentes cellules du système immunitaire, tantôt permissive, tantôt suppressive. À faible concentration, le Cort permet de stimuler la réponse immunitaire tandis qu'à forte dose l'on constate une immunosuppression généralisée de défenses de l'organisme. Les blessures causant un traumatisme sévère, par exemple des brûlures du 2e ou 3e degré couvrant une surface importante du corps (> 20%) causent une hypercorticolémie. Cette situation engendre à son tour une défaillance globale du système immunitaire prédisposant ainsi les patients gravement brûlés aux infections bactérienne et au choc septique, ce qui augmente l'incidence de mortalité chez ces derniers.

Des études ont été entreprises afin de mieux comprendre les paramètres qui exercent un rôle dans le contrôle des niveaux de Cort, suite au traumatisme de la brûlure et donc, de caractériser l'importance de la régulation de cet hormone et de son action sur le système immunitaire. Notre hypothèse de départ stipulait que la CBG est le principal élément de régulation de l'activité du Cort dans l'organisme. Pour prouver celle-ci, nous avons, en premier lieu, établi la cinétique des niveaux de l'hormone et de son transporteur principal, la CBG, dans un modèle expérimental de brûlure sévère. En second lieu, nous avons caractérisé les variations, qui peuvent survenir suite à une brûlure sévère, dans la forme de l'hormone, soit libre ou liée à sa protéine de transport.

Notre seconde hypothèse reliait l'atrophie thymique observée lors d'un traumatisme sévère à l'augmentation de la concentration de Cort biologiquement actif. Or, de précédantes recherches ont rapporté une atrophie thymique faisant suite à un traitement

aux GC. Étant donné l'étroitesse du lien qui existe entre le système endocrinien et le développement des cellules T dans le thymus, nous avons chercher à déterminer si le changement observable dans les formes du Cort suite à une brûlure sévère corrèle avec la modification des populations de cellules T dans le thymus.

Finalement, notre dernier objectif visait l'étude des effets de la Bup, cet analgésique administré comme anti-douleur chez nos souris, sur les niveaux de Cort, de CBG et le thymus. Cela nous permît de discriminer tout impact possible de la drogue sur les divers paramètres dont la régulation serait aussi affectée par la brûlure. Ici, l'intérêt d'utiliser la Bup au détriment de la morphine dans notre modèle expérimental était justifié par l'effet connu de la morphine sur les niveaux plasmatiques de CBG et son caractère immunosuppressif sur les cellules T. Notre étude fut la première à s'intéresser aux effets conjoints de la Bup, administrée de manière chronique, sur certains paramètres des systèmes immunitaire et endocrinien. Une meilleure compréhension des effets à long terme de la drogue s'avère bénéfique dans le traitement de la douleur chez des patients gravement brûlés.

Ce mémoire sera divisé en deux sections, la première comprenant une revue de la littérature divisée en quatre chapitres; la seconde composée de deux articles scientifiques recensant l'essentiel de mes travaux de recherches. Dans le premier chapitre, il sera question de la réponse hormonale de l'organisme au stress causé par un traumatisme. Le second chapitre s'intéressera au rôle et à la régulation de la CBG. Le chapitre suivant portera sur les interactions existant entre les hormones GC et le système immunitaire. Finalement, le dernier chapitre expliquera la réponse de l'organisme au stress de la brûlure et portant une attention particulière au traitement de la douleur par l'utilisation des drogues opiacées.

Première partie

Revue de littérature

1. Réponse hormonale de l'organisme au stress causé par un traumatisme sévère

Le stress est définit comme tout stimulus qui perturbe l'homéostasie dans l'organisme (Selye, 1936). Ainsi, le stress peut être de nature émotionnelle ou psychologique, mais aussi physiologique comme c'est le cas avec une chaleur ou un froid intense, un traumatisme, une opération chirurgicale ou l'infection. Le stress peut affecter tous les organes et systèmes de notre organisme, mais les principaux médiateurs de la réponse au stress sont le système nerveux sympathique et l'axe HPA (McCann *et al.*, 2000).

Lors d'un traumatisme sévère, de nombreux événements se produisent au sein de l'organisme reliant du même coup les systèmes neurologique, endocrinien et immunitaire. L'activation de l'axe HPA suite au relâchement d'adrénaline dans l'organisme est une des premières conséquences observées. Elle conduit à la production successive de corticotropin releasing factor (CRF), d'adrenocorticotropin hormone (ACTH) et de Cort (Alexander, 1990).

Le Cort est la plus importante et la plus abondante hormone de stress et possède une activité pléïtropique sur l'organisme. Le Cort induit des effets physiologiques en contrôlant la catabolisme des protéines et des lipides ce qui augmente la quantité de glucose dans la circulation (Sapolsky *et al.*, 2000). Le Cort contrôle l'homéostasie électrolytique, la pression sanguine en potentialisant l'effet des récepteurs β-adrénergiques sur la vasoconstriction des vaisseaux sanguins, la respiration, l'activité des muscles squelettiques ainsi que la réponse inflammatoire et immunitaire. Ce dernier point est particulièrement important dans le cas d'une brûlure sévère puisque l'on assiste à la fois à une inflammation d'ordre systémique et à une hyperproduction de Cort (Sapolsky *et al.*, 2000). Le Cort est reconnu pour diminuer l'inflammation en affectant l'activité des macrophages c'est-à-dire le relâchement de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'oxyde nitreux (NO), les prostaglandines (PGE_2) et les cytokines : l'interleukine-1 (IL-1), le facteur nécrosant des tumeurs (TNF-α) et le facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) (Attur *et al.*, 2000). D'autre part, les cytokines pro-

infllammatoires telles que IL-1, l'IL-6 et le TNF-α viennent directement stimuler l'axe HPA amplifiant l'activité de l'axe (Alexander, 1990). Il existe donc un lien étroit entre la production d'hormones de stress et la réponse immunitaire. Dans ce chapitre, nous décrirons le fonctionnement de l'axe HPA en relation avec les stress.

1.1 L'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien

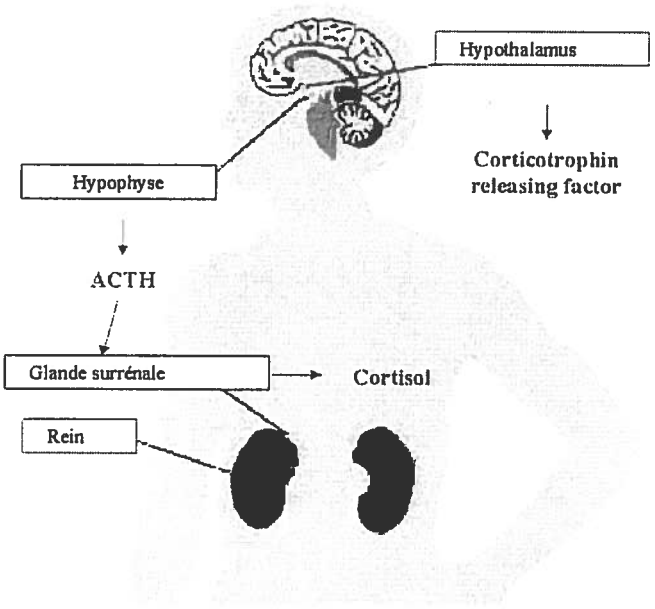


Figure 1 : L'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien (HPA)

La réponse de l'organisme au stress implique l'activation de l'axe HPA et conduit à la production de glucocorticoïdes (GC). Sous des conditions normales l'axe est auto-régulé, le Cort dans la circulation agissant par rétro-inhibition d'une part, en diminuant la production de CRF et d'autre part en inhibant le relâchement d'ACTH (Kretz *et al.*, 1999). La concentration en Cort dans la circulation est variable et depend du rythme circadien de l'organisme. 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 est également vrai pour les organismes nocturnes (Angeli, 1974). L'activité de l'axe est aussi bien régulée par des stress de nature psychologique que physiologique. Les cytokines pro-inflammatoires de même que

la quantité de GC circulant contrôlés par les niveaux de transporteur sont tous des éléments important qui agissent sur la production de GC lors d'un stress intense.

1.1.1 Fonctionnement de l'axe: physiologie

L'axe HPA est constitué de 3 éléments principaux : l'hypothalamus, l'hypophyse et les glandes surrénales. Son activité est tributaire du relâchement de médiateurs par ces-derniers. La production de GC est initiée au niveau de l'hypothalamus par la libération du facteur de relâchement de corticotrophin (CRF) (McCann *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 CRF possèdent des projections à l'extérieur de l'hypothalamus permettant le relâchement de l'hormone à travers un réseau de capillaires sanguins qui effectuent la communication entre l'hypothalamus et l'hypophyse. L'adénohypophyse est la partie vascularisée de la glande qui reçoit les capillaires provenant de la zone médiane entre l'hypothalamus et l'hypophyse (Elenkov *et al.*, 2000). C'est à cet endroit que le CRF interagit avec le récepteur CRF-R1 couplé aux protéines G présent à la surface des cellules corticotropes de l'hypophyse. La stimulation du récepteur provoque la relâchement du peptide précurseur de l'hormone adrenocorticotropin (ACTH), de proopiomelanocortin (POMC), d'ACTH et d'autres peptides dérivés de POMC. Par la suite, l'ACTH rejoint la circulation sanguine et induit la synthèse de GC dans la zone fasciculata des glandes surrénales (Turnbull et Rivier, 1997).

Les GC sont synthétisées à partir du cholestérol en suivant une cascade séquentielle d'évènements effectués par diverses enzymes membres de la famille des cytochromes P450. L'étape terminale de cette cascade enzymatique est le résultat de l'action de la 11β-hydroxysteroid deshydrogenase de type 1 (11β-HSD1). Cette étape se caractérise par l'interconversion enzymatique de GC actifs 11-hydroxy (corticosterone et cortisol) effectuée par la 11β-HSD1 et de leurs formes inactives 11-ceto (cortisone et 11-dehydrocorticosterone) produites par le travail de la 11β-HSD2 (Seckl et Walker, 2001).

1.1.2 Rôle des GC dans l'organisme

Les GC exercent plusieurs fonctions dans l'organisme. Premièrement, au niveau métabolique, les GC favorisent le catabolisme des graisses et des protéines et permettent la gluconéogénèse par les cellules hépatiques (Sapolsky *et al.*, 2000). 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 lypolitique des catécholamines (adrénaline et noradrénaline) ainsi que la redistribution des graisses de la périphérie au tronc. Les GC régulent la balance électrolytique en augmentant l'absorption de Na^+, en diminuant l'absorption de Ca^{2+} ainsi qu'en favorisant l'excrétion des ions K^+ et H^+ par les cellules du tractus gastro-intestinal (Sapolsky *et al.*, 2000). Les GC contrôlent la masse osseuse en contrant le processus de minéralisation régulé par l'effet de la vitamine D1 sur l'activité des ostéoblates (Patschan *et al.*, 2001). Ceci est effectué par une action directe des GC sur les ostéoblastes en diminuant la transcription du gène de l'ostéocalcine via une élément de régulation négatif contenu dans le promoteur du gène (Meyer *et al.*, 1997). Le rôle principal des GC sur le système cardio-vasculaire est de maintenir la pression sanguine (Grunfeld, 1990). Ceci est réalisé en potentialisant l'action vasoconstrictrice des récepteurs β-adrénergiques sur les petits vaisseaux sanguins, en diminuant la perméabilité vasculaire en augmentant l'hémoglobine et le nombre de globules rouges dans la circulation sanguine. Les GC agissent aussi sur la relaxation des muscles squelettiques et sont essentiels au bon fonctionnement (Sapolsky *et al.*, 2000). Finalement, un effet très étudié des GC est la régulation qu'ils exercent sur la réponse immunitaire et inflammatoire. Les GC suppriment la réponse inflammatoire en agissant directement sur les effecteurs de l'immunité non-spécifique soit les monocytes/ macrophages et neutrophiles en diminuant leur activité, la production de médiateurs pro-inflammatoires, le relâchement de protéase, leur activité migratoire et de phagocytose (Webster *et al.*, 2002). Les GC agissent aussi sur l'immunité spécifique en favorisant la production de cytokines de type Th2 par les lymphocytes T (Sapolsky *et al.*, 2000). L'effet des GC sur la réponse immunitaire sera étudié plus en détails dans un autre chapitre.

1.1.3 Régulation de l'axe HPA lors d'un stress

Des nombreux médiateurs de la réponse au stress peuvent moduler l'activité de l'axe HPA. L'axe est en premier lieu activé par la présence de neurones sensibles à des stress physiologiques (douleur, chaleur, traumatisme) ce qui provoque la sécrétion de CRH (Dorshkind et Horseman, 2001). Cette activité peut être modulée par les cytokines pro-inflammatoires relâchées très rapidement et en grande quantité lors d'un traumatisme sévère (Dunn, 2000). Les cytokines pro-inflammatoires régulent l'axe en passant par la circulation sanguine, mais aussi de manière paracrine puisque leur production et la présence de récepteurs spécifiques fut démontré au niveau du cerveau (Turnbull et Rivier, 1999). Aussi, le contrôle de la sécrétion de Cort par les glandes surrénales est effectué par rétro-inhibition de l'activité de l'axe. Étant donné l'importance du transport hormonal dans la régulation des niveaux de Cort biologiquement actifs, une variation dans la capacité de liaison de la CBG peut grandement influencer l'activité de l'axe HPA (Dorshkind et Horseman, 2001).

1.1.3.1 Rôle des GC

Les GC régulent par rétro-inhibition l'activité de l'axe HPA (Shipston et Antoni, 1992). Cette situation prévaut la plupart du temps et contribue à maintenir l'homéostasie dans l'organisme. Les GC régulent l'activité de l'axe en se liant à leur récepteur cytosolique spécifique présent au niveau des cellules corticotrophes productrices d'ACTH et en limite la production (Shipston et Antoni, 1992). En fait, ces cellules relâchent de l'ACTH lorsque stimulées par le CRF. Le relâchement d'ACTH est induit via l'accumulation intracellulaire d'AMPc, l'activité de la protéine kinase A et son action sur les canaux de potassium (Lim *et al.*, 2002). Les GC rendent ces cellules insensibles au CRF en inhibant la phosphorylation des canaux de potassium, probablement via l'activité d'une protéine phosphatase (Tian *et al.*, 1998).

1.1.3.2 Rôle des cytokines

Les cytokines pro-inflammatoires sont reconnues comme étant en mesure de réguler positivement l'activité de l'axe HPA. L'IL-1β et à un degré moindre, le TNF-α et l'IL-6 augmentent l'activité 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 corticotrophes de l'hypothalamus et de l'hypophyse (Elenkov *et al.*, 2000). Deux voies sont envisagées pour expliquer la présence de ces cytokines au niveau du liquide céphalo-rachidien. Premièrement, les cytokines produites au niveau des sites inflammatoires rejoignent la circulation sanguine et leur liaison sur leurs récepteurs spécifiques présents au niveau de l'hypophyse et de l'hypothalamus favorisent la libération de CRF et d'ACTH (Perlstein *et al.*, 1993). Deuxièmement, c'est une production locale de cytokines dans le cerveau qui active directement l'axe HPA. Les neurones du cerveau expriment les ARNm encodant pour les cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-6 et TNF-α (Dunn, 2000; Turnbull et Rivier, 1999). Une injection intrapéritonéale de LPS bactériens favorise l'expression dans le cerveau et l'hypophyse des ARNm encodant pour l'IL-1β et de l'enzyme de conversion de l'IL-1 (ICE), responsable du clivage de la pro-protéine IL-1β en sa forme mature et active. La présence de cette cytokine augmente à son tour l'expression de l'enzyme du NO synthétase inductible (iNOS). Par la suite, la production de NO active le relâchement de CRH par les neurones via l'activité de l'enzyme cyclo-oxygénase-1 (COX-1). Ce mécanisme génère des prostaglangines (PGE_2) qui activent l'enzyme adenylyl cyclase, augmentant la quantité d'AMPcyclique intracellulaire et favorisant l'exocytose de CRH contenu dans des granules (McCann *et al.*, 2000).

En ce qui concerne l'IL-6, la production de cette hormone entraîne l'activation de l'axe HPA en aval du relâchement de CRH (Lyson et McCann, 1993). Les cellules folliculostellaires situées au niveau de l'hypophyse produisent de l'IL-6. Elles expriment à leur surface le CD14 et le récepteur Toll-like de type 4, tous deux impliqués dans la liaison des LPS (Chesnokova et Melmed, 2002). Cette liaison induit la phosphorylation de la protéine p38 impliquée dans la cascade de signalement des MAPKinases (mitogen

activated protein kinase) et de IκB, un inhibiteur de la liaison du facteur de transcription NF-κB au promoteur du gène de l'IL-6 (Lohrer *et al.*, 2000). De plus, les cellules corticotrophes et adrenocorticales possèdent le récepteur pour l'IL-6. Ainsi, la production locale d'IL-6 permet une régulation paracrine de l'activité des cellules corticotrophes et le relâchement d'ACTH au niveau de la circulation (Bethin *et al.*, 2000).

1.1.3.3 Rôle du transport hormonal

Les GC sont des molécules hydrophobes, donc insolubles dans le sang. La biodisponibilité des GC dans la circulation est tributaire de l'activité de l'axe HPA, donc de la production de l'hormone, mais aussi et surtout de leur transport dans la circulation par des protéines plasmatiques, principalement la CBG. La CBG séquestre 90 % du Cort et constitue un réservoir potentiel de l'hormone. Seul le Cort à l'état libre est biologiquement actif. Donc, un changement dans les niveaux de CBG influence grandement la disponibilité et l'action du Cort dans l'organisme (Garrel, 1996). Les niveaux de CBG sont constants durant la journée et varient seulement lors de la grossesse. Toutefois, en situation post-traumatisme, une baisse marquée des niveaux de CBG dans la circulation fut remarquée de même qu'une hausse des niveaux de Cort libre (Beishuizen *et al.*, 2001).

2. La transcortine

La présence de transcortine ou corticosteroid-binding globulin (CBG) dans le sérum des humains fut décrite vers la fin des années 50 (Heyns et Coolens, 1988). Elle fut alors l'identifiée comme le transporteur de haute affinité pour les GC. La CBG est une glycoprotéine monomérique dont le poids moléculaire varie entre 50 et 60 kDa qui exerce, comme fonction principale, le transport des GC dans le plasma via un site de liaison unique (Heyns et Coolens, 1988). Depuis, nombreuses études ont été menées ciblant entre autre, les propriétés physico-chimiques de la protéine, sa synthèse, sa distribution, son métabolisme et plus récemment, son importance dans le contrôle de la biodisponibilité du Cort, l'identifiant ainsi comme un facteur important dans la régulation des effets de l'hormone sur l'organisme.

2.1 Propriétés générales

La transcortine est retrouvée principalement dans la circulation sanguine, au niveau de la lymphe, des liquides intra péritonéal et amniotique ainsi que dans le lait maternel. La demie-vie de la CBG dans la circulation est d'environ 3 jours. Elle est éliminée à la suite de sa transformation en dérivé asialo-CBG et sa fixation au récepteur à asialoglycoprotéines présent à la surface des cellules hépatiques (Rosner *et al.*, 1988). La transcortine est une protéine dont l'homologie est faible entre les espèces, mais dont le poids demeure relativement stable se situant entre 44.2 et 60.0 kDa (Heyns et Coolens, 1988). L'importante glycosylation de cette protéine explique pourquoi certains anticorps (Ac) réagissant spécifiquement contre la CBG humaine possèdent une efficacité réduite pour la CBG de rat ou de cochon d'inde (Kato *et al.*, 1988). Le degré de similarité inter-espèce des séquences peptidiques de la CBG est faible lorsque comparée à d'autres protéines (60 à 70%). De plus, cette différence inter-espèce est accentuée par le niveau de glycosylation de la protéine (Nyberg *et al.*, 1990). La CBG murine est formée à 20.4% de carbohydrates, majoritairement de l'acide sialique, tandis que ce pourcentage est plus élevé pour la CBG humaine, de rat ou de cochon d'inde (Nyberg *et al.*, 1990). Toutefois, comme le degré de glycosylation n'a pas d'effet sur la liaison des stéroïdes et que les

différences inter-espèce existant au niveau du peptide sont retrouvées dans des régions peu conservées, il est peu probable que ces variations aient une importance biologique (Hammond *et al.*, 1991).

Le cDNA complet de la CBG humaine code pour un polypeptide précurseur de 405 acides-aminés, qui une fois sa séquence « leader » excisée, deviendra un produit de 383 acides-aminés (Strel'chyonok et Avvukumov, 1990). Une variante de la CBG fut découverte dans le sérum des femmes enceintes (Seralini *et al.*, 1989). Les propriétés physico-chimiques de cette forme particulière de la protéine sont semblables en tous les points de vue à la CBG régulière, si ce n'est qu'elle possède exclusivement des chaînes de carbohydrates tri-antennées. D'ailleurs, cette particularité semble être importante dans la liaison de la CBG à la membrane du tissu placentaire. De plus, elle origine de la mère puisqu'elle n'est pas présente au niveau du cordon ombilical. Sa synthèse débute dès le premier mois de la grossesse, atteignant une concentration maximale dans le sérum au 9e mois (Strel'chyonok et Avvukumov, 1990).

2.2 Le gène de la CBG

La CBG est un membre de la superfamille des inhibiteurs de sérine protéase (SERPINs), il n'est donc pas surprenant de retrouver des gènes encodant pour des protéines membres de cette famille dans une même région. En effet, le gène de la CBG est situé non loin de ceux codant pour l'α-1 antitrypsine et l'α-1 antichimotrypsine, plus précisément sur le chromosome 12 chez la souris (Hammond *et al.*, 1991). Cette région est synténique chez l'humain, c'est-à-dire qu'elle est conservée et confinée au « cluster » q32, soit une zone s'étalant sur plus de 280 kb situé sur le chromosome 14. Les gènes murins et humains de la CBG sont constitués de 5 exons dont 4 contiennent la séquence complète du polypeptide précurseur et occupent respectivement 10.5 kb et 19 kb (Hammond *et al.*, 1991). Le gène de la CBG a été étudié chez le rat et les éléments de régulation agissant en « cis » c'est-à-dire directement sur la transcription du gène furent identifiés (Orava *et al.*, 1994).

Le promoteur du gène de la CBG chez le rat contient des séquences de reconnaissance, hautement conservées chez l'humain, pour les facteurs de transcription : HNF-1, CP-2, DBP, HNF-3, C/EBP et NF-IL6 (Underhill et Hammond , 1995). Il a été démontré que les GC réprimaient la transcription du gène de la CBG (Smith et Hammond, 1992). Toutefois, le promoteur de ce gène ne contient pas d'élément de réponse aux GC, ce qui laisse supposer une action inhibitrice indirecte du stéroïde via une interaction physique avec d'autres facteurs empêchant du même coup la transcription du gène. Divers facteurs viennent réguler le niveau de transcription du gène de la CBG. On peut citer le contrôle qu'exercent l'axe HPA, l'IL-6 ainsi que l'insuline (Smith et Hammond, 1992).

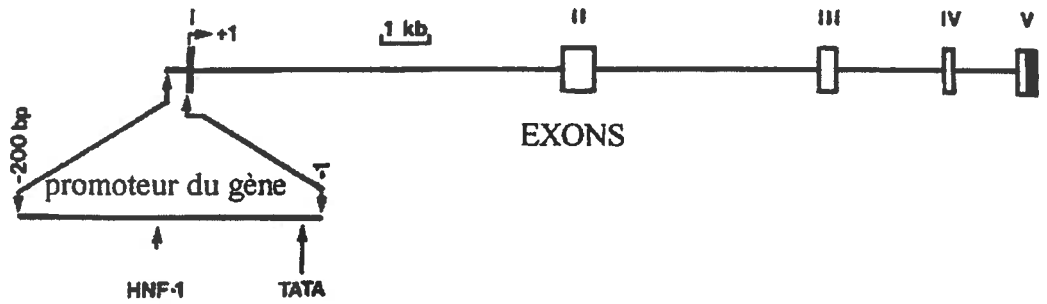


Figure 2 : Gène humain de la CBG composé de 5 exons et de son promoteur (Hammond *et al.*, 1991)

2.2.1 Régulation de l'expression du gène de la CBG

Le fœtus produit de la CBG et l'expression du gène de la protéine a été noté au niveau du foie et des reins (Strel'chyonok et Avvukumov, 1990). Vers la fin de la grossesse, il y a développement de la fonction hypophyso-surrénale qui s'accompagne d'une augmentation de la production de Cort chez le fœtus. Par contre, durant la réaction inflammatoire systémique, il a été observé, conjointement à l'action des GC, l'effet inhibiteur de l'IL-6 sur la transcription du gène de la CBG (Bartalena *et al.*, 1993).

Un des mécanismes moléculaires de régulation de la transcription du gène de la CBG implique l'activité de transactivation des facteurs HNF-1β, CP-2, HNF-1α et HNF-4 (Zhao *et al.*, 1997). En effet, il a été démontré chez le rat que le promoteur de la CBG possédait deux sites de liaisons distincts (appelés P1 et P2) respectivement pour les

facteur HNF-1β et CP-2. Des études plus poussées ont permis de révéler qu'une délétion de P1 était sans conséquence tandis que la disparition de P2 diminuait grandement l'activité de transcription du gène (Zhao et al., 1997). De plus, HNF-1α et HNF-4 sont essentiels à l'expression du gène de la CBG puisqu'une cellule ne possédant pas ces deux facteurs ne démontre aucune activité de transcription pour les gènes de la famille des SERPINs. HNF-1α et HNF-4 ont un rôle à jouer dans la réorganisation de la chromatine rendant ainsi accessible le promoteur du gène à l'ARN polymerase et la transcription possible (Rollini et Fournier, 1999). Aussi, diverses molécules peuvent augmenter le niveau d'AMPc intracellulaire chez des hépatocytes en cultures. L'ajout d'hormone tri-iodothironine (T_3) ou de polypeptide activateur de l'adenylate cyclase (PACAP) provoque une hausse de la concentration d'AMPc intracellulaire chez des hépatocytes, mais s'accompagne aussi d'une augmentation de la production de CBG (El-Fahime *et al.*, 1996). Toutefois, le promoteur du gène de la CBG ne comporte aucun élément de réponse à l'AMPc (CRE). On peut supposer une interaction entre la protéine de liaison au CRE et d'autres facteurs de transcription (El-Fahime *et al.*, 1996).

2.2.1.1 Effets de l'axe HPA sur la transcription du gène de la CBG

L'expression du gène de la CBG semble être régulé par l'activité de l'axe HPA dès le stade fœtal. Il fut noté qu'une hausse des niveaux de Cort était associée à une augmentation de la concentration de la CBG fétale (Strel'chyonok et Avvukumov, 1990). Ce changement dans la production du transporteur est causée par une hausse des niveaux d'ACTH relâché par l'hypophyse (Jacobs *et al.*, 1991). La hausse des niveaux de CBG vient tamponner l'augmentation des niveaux de Cort libre et atténue par le fait même, le mécanisme de rétro-inhibition qui s'exerce au niveau de l'hypophyse, permettant du même coup une synthèse soutenue d'ACTH qui accompagne les derniers moments de la grossesse (Berdusco *et al.*, 1995). Toutefois, en situation de stress intense, il a été démontré qu'une augmentation de l'activité de l'axe HPA, donc de la production d'ACTH et de Cort, causait avec un délai de 24 à 48 heures, une forte diminution des niveaux de CBG dans la circulation (Tannenbaum *et al.*, 1997). De plus, une surrénalectomie suivie d'une période de stress intense semble prévenir la chute des

niveaux de CBG chez les rats opérés. Par contre, l'utilisation de RU-486, un inhibiteur du récepteur à GC, ne semble pas être protecteur puisque une forte diminution de la concentration en CBG plasmatique fut observée (Marti *et al.*, 1997). Par ailleurs, une autre étude rapporte des résultats contraires (Cole *et al.*, 1999). Il semble que le récepteur à GC soit essentiel pour maintenir une répression basale et induite du gène de la CBG. En effet, des souris « knockout » pour le récepteur à GC (GR) démontrent des niveaux plus élevés d'expression du gène de la CBG dans le foie. L'utilisation de dexamethasone (Dex), un puissant GC synthétique causa une forte diminution de l'expression hépatique du gène de la CBG. Cette baisse ne fut pas observée chez des souris GR -/- (Cole *et al.*, 1999). L'effet du Dex sur la transcription du gène de la CBG semble être relié au stade de développement des cellules hépatique. Il fut prouvé que les GC augmentaient l'expression du gène de la CBG au niveau du fœtus, de même que sur la lignée cellulaire HepG2 (Cole *et al.*, 1999). Ces cellules exhibent un phénotype fœtal. Donc, les GC ont un effet soit positif ou négatif sur la transcription du gène de la CBG dépendant du stade de différentiation des cellules hépatiques (Emptoz-Bonneton *et al.*, 1997).

2.2.1.2 Effets de l'interleukine-6 sur la transcription du gène de la CBG

La réaction inflammatoire systémique s'accompagne d'une augmentation des niveaux d'IL-6 dans la circulation. Il a été démontré que cette cytokine inhibe la synthèse de CBG par des cellules issues de la lignée hépatique (HepG2). Ceci est causé par une diminution de la stabilité de l'ARNm de la CBG puisque aucun effet au niveau de la transcription du gène ne fut observé (Bartalena *et al.*, 1993). Aussi, une forte relation entre l'augmentation de la concentration d'IL-6 dans le plasma et la baisse de la capacité de liaison de la CBG fut observée chez des patients gravement brûlés ou polytraumatisés (Bernier *et al.*, 1998; Beishuizen *et al.*, 2001). L'IL-6 agit au niveau systémique en augmentant l'activité de l'axe HPA (Dunn, 2000). Cette cytokine favorise la production de GC au niveau des glandes surrénales ou la production d'ACTH et de CRH respectivement au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse ce qui, comme décrit précédemment, cause une diminution de la synthèse de CBG. Une étude supplémentaire vient confirmer l'effet inhibiteur de l'IL-6 sur la production de la CBG (Bartalena *et al.*, 1993). En effet, une

baisse de la transcription du gène de la CBG par des cellules HepG2 fut remarquée de manière dose dépendante. Cette relation est en lien direct avec la présence du site de liaison pour le facteur NF-1IL-6 au niveau du promoteur du gène de la CBG. L'IL-6 agit en réprimant la transcription du gène, peut-être en recrutant des molécules co-répresseurs (Bartalena *et al.*, 1993). Malheureusement, aucune étude supplémentaire n'a été effectuée sur le sujet et l'on ne peut, pour le moment, que spéculer sur le mécanisme emprunté par l'IL-6 pour réguler la transcription du gène de la CBG. Un fait intéressant à soulever, il fut démontré que l'IL-6 augmentait l'expression des chaînes gp80 et gp130 constituant son récepteur à la surface des cellules hépatiques. De plus, l'ajout de Dex favorise cet événement. On peut donc affirmer que les effets de l'IL-6 sur la transcription du gène de la CBG débutent avec l'augmentation de l'expression de son récepteur à la surface des hépatocytes (Emptoz-Bonneton *et al.*, 1997).

2.3 Synthèse de la CBG

La CBG est principalement synthétisée dans le foie, in vitro sa production fut démontrée par des hépatocytes mis en culture (Bartalena *et al.*, 1993). Par ailleurs, de nombreuses études ont observé l'expression du gène de la CBG dans divers autres tissus. Le gène de la CBG est exprimé chez le lapin au niveau de la rate et des ovaires, chez le singe Rhésus au niveau des testicules et du rein, chez les humains au niveau du poumons et chez le fœtus au niveau des tubules rénaux (Seralini, 1996). Toutefois, le degré d'expression du gène de manière extra-hépatique est extrêmement faible, seulement quelques cellules expriment le gène et produisent un transcrit primaire encodant pour la CBG (Hammond *et al.* 1987). Plus récemment, l'expression du gène de la CBG fut démontré au niveau de la lignée cellulaire Ishikawa issue d'un carcinome de l'endomètre de même qu'au niveau des cellules formant la couche du syncytiotrophoblaste du placenta humain. (Misao et *al.*, 1998; Misao *et al.*, 1999). Ils observèrent une augmentation de la transcription du gène suite à un traitement avec l'estrogène et l'effet contraire causé par la progestérone. Il montrèrent que l'endomètre était en mesure d'accumuler de la CBG durant les menstruations chez le hamster, suggérant un rôle pour la protéine dans le transport

spécifique de la progestérone et du Cort durant les premiers instants de la grossesse (Selcer et Leavitt, 1988).

2.3.1 Modification post-traductionnelle : la N-glycosylation

Le processus de synthèse de la CBG inclut une importante étape de maturation de la protéine. Le CBG subit la N-glycolysation avant d'être excrétée par les cellules hépatiques. Cette étape vise à augmenter sa stabilité dans la circulation, favoriser son repliement et augmenter sa capacité de liaison aux membranes (Murata *et al.*, 1989). La glycosylation est une réaction biochimique qui consiste à ajouter des chaînes de carbohydrates. Elle s'effectue à la surface du réticulum endoplasmique et implique tout un système de reconnaissance des peptides nouvellement synthétisés par les ribosomes. Ce processus survient lorsque l'enzyme oligosaccharyltransferase (OST) reconnaît une séquence consensus de type [Asn-X-Ser/Thr] sur un peptide et y effectue, avant que la protéine ne soit sécrétée par les cellules productrices, la N-glycosylation à partir de l'acide aminé asparagine (Wilson *et al.*, 1998). En fait, elle procède à l'ajout d'un oligosaccharide, toujours identique. Cet oligosaccharide contient 14 chaînes de sucres (sucres à six carbones ou dérivés chimiques de sucres à six carbones). Il est constitué de deux molécules de GlcNAc (N-acétylglucosamine) suivies de neuf molécules de mannose et de trois molécules de glucose (Wilson *et al.*, 1998). Convenablement repliée, la glycoprotéine va subir l'action des glucosidases et des mannosidases. Elle sera alors rapidement transférée dans un premier compartiment, les vésicules (*cis*) de l'appareil de Golgi. Les glycoprotéines qui arrivent dans les premières vésicules de l'appareil de Golgi possèdent donc les mêmes résidus oligosaccharidiques à leur surface. C'est dans ce compartiment que commence à s'effectuer le tri des protéines selon leur destination terminale et l'ajout des molécules de mannose-6-phosphate (Wilson *et al.*, 1998). Les protéines destinées à être sécrétées ou à se trouver sur la membrane externe de la cellule vont subir de grandes modifications au niveau de la chaîne oligosaccharidique dans les compartiments médian et trans de l'appareil de Golgi. On observera dans les vésicules *(median)*, l'ajout de molécules supplémentaires de GlcNAc et dans les vésicules *(trans)*,

l'addition en bout de chaîne d'une molécule de N-acétyl neuraminique ou d'acide sialique (Singer et Borg, 1992).

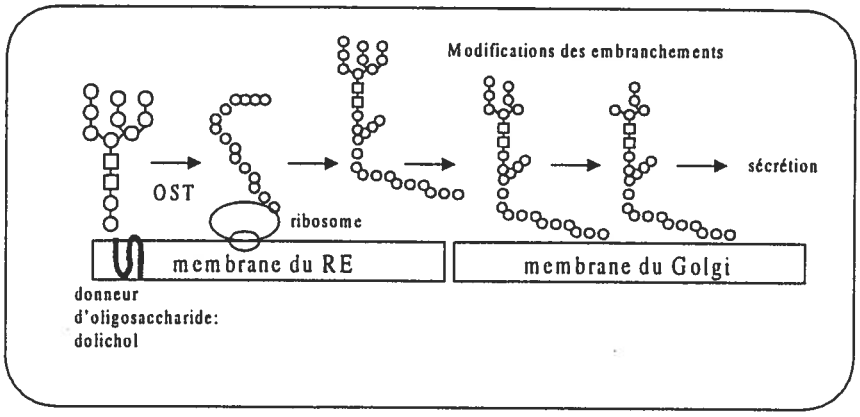


Figure 3 : Schéma général du processus de la N-glycolysation

2.3.1.1 Les sites de glycosylation : localisation et rôle

Le contenu en carbohydrates de la transcortine représente 25 % de sa masse moléculaire totale (Akhrem *et al.*, 1982). Pour chaque mole de CBG isolée on obtient 5 moles d'oligosaccharides (Akhrem *et al.*, 1982). Des études effectuées à partir d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc) issues de cellules du foie, ont permi d'affirmer que la CBG humaine renferme six sites potentiels pour la N-glycosylation. Toutefois, on ne retrouve que 5 chaînes latérales de carbohydrates sur le peptide, ce qui suggère qu'un des sites est non fonctionnel ou partiellement utilisé (Hammond *et al.*, 1987).

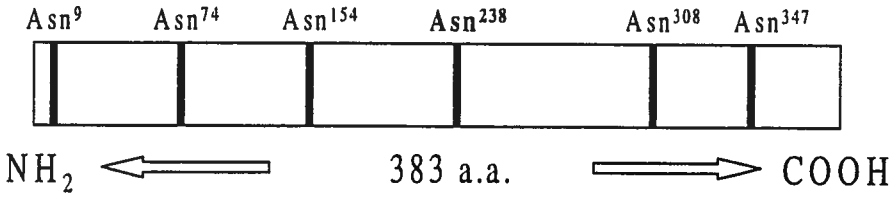


Figure 4 : Emplacement des sites de glycosylation de la CBG

Une des raisons évoquées pour expliquer l'importance du processus de glycosylation pour la CBG est son possible rôle dans la sécrétion de la protéine. Murata *et al.* (1989) ont étudié parallèlement l'effet de la glycosylation dans la production et la sécrétion de la

TBG et de la CBG par la lignée cellulaire hépatique HepG2. Ils ont démontré que l'utilisation de la tunicamycine (TM), un inhibiteur de la N-glycosylation, empêchait la sécrétion de TBG mais ne faisait que ralentir celle de la CBG. Ceci suggère que la glycosylation n'est pas indispensable, mais facilite la sécrétion de la protéine par les cellules productrices. De plus, ils montrèrent en utilisant un Ac spécifique pour la CBG native, que la structure tertiaire de la protéine conférée par la glycosylation n'influençait pas ses propriétés immunologiques, c'est-à-dire que la liaison de l'Ac à la CBG native et aux différentes formes glycosylées de la protéine était comparable.

La glycosylation de la CBG est un événement indispensable à l'augmentation de sa stabilité donc, sa protection contre une probable dégradation intracellulaire précédant sa sécrétion. En effet, Murata *et al.* (1989) observèrent que l'utilisation de la TM causait une dégradation intracellulaire de la CBG plus importante et diminuait par le fait même, sa sécrétion. Une chaîne de carbohydrates rattachée aux a.a. Asn^{74} et/ou Asn^{238} est suffisante pour permettre la sécrétion de la CBG tandis qu'une mutation dans un ou l'autre de ces deux sites résulte en une diminution marquée de la sécrétion de la protéine (Avvakumov *et al.*, 1993). En outre, la séquence consensus où se retrouve l'Asn^{238} est très conservée parmi toutes les espèces où la CBG fut étudiée. De plus, une substitution des a.a. Asn^{238} et Thr^{240} respectivement avec les a.a. Gln et Ala inhibe totalement la liaison de l'hormone au transporteur. Avvakumov *et al.* (1993) ont affirmé que la glycosylation effectuée à partir de l'Asn^{238} était essentielle à la liaison du stéroïde par la CBG. La présence de chaînes de carbohydrates peut protéger les glycoprotéines d'une dégradation protéolytique, améliorer leur solubilité et stabiliser leur conformation. Des études menées antérieurement avaient démontré l'importance de l'interaction entre les chaînes glycosylées et l'acide aminé tryptophane dans le repliement de l'α1-antitrypsin (Hammond *et al.*, 1987; Powell et Pain, 1992). En se basant sur la similarité des séquences entre l'α1-antitrypsin et la CBG, Avvakumov et Hammond (1994a) comparèrent les ADNc encodant pour la CBG chez diverses espèces et trouvèrent 4 résidus Trp fortement conservés, soit en position 141, 185, 266 et 371. Par la suite, ils démontrèrent qu'une mutation au niveau de l'a.a. Trp^{266} abolissait la sécrétion de la glycoprotéine. Donc, l'interaction probable entre la chaîne de carbohydrates liée au

peptide sur l'Asn^{238} et l'a.a. Trp^{266} influence le repliement du peptide en élongation donc, la formation du site de liaison pour le stéroïde. De plus, dans une étude parallèle, Avvakumov et Hammond (1994b) trouvèrent que l'a.a. Trp en position 371 était compris dans le site de liaison avec le stéroïde. Ils démontrèrent que la substitution du Trp^{371} par divers a.a. résultait toujours en une diminution de l'affinité de la CBG pour l'hormone.

2.3.2 Modulation de la synthèse de la CBG

La concentration de la CBG dans le sérum varie entre les espèces, sa présence est faible chez le cochon, moyenne chez les humains et forte chez le rat et la souris. De plus, des changements dans la production de la protéine ont été remarqué lors de la grossesse, de la réponse inflammatoire et conséquemment à divers traitements hormonaux (androgènes, estrogènes, progestérone, corticostéroïdes) (El-Fahime *et al.*, 1994; Smith et Hammond, 1992) . La CBG est synthétisée par le fœtus, principalement au niveau du foie et du rein, en des concentrations réduites mais croissantes pour atteindre un niveau équivalent à la moitié de la concentration de la protéine chez l'adulte (Heyns et Coolens, 1988). Au cours du premier mois suivant la naissance, la concentration de la CBG dans la circulation augmente rapidement et des niveaux maximaux, bien supérieurs à ceux retrouvés chez l'adulte, sont mesurés chez un enfant âgé entre 2 et 8 ans (Heyns et Coolens, 1988). Par la suite, les niveaux déclinent et oscillent autour de 40 mg/L durant l'âge adulte (Heyns et Coolens, 1988). Le rythme circadien, le sexe et le cycle menstruel n'exercent aucun contrôle dans les niveaux de trascortin (Heyns et Coolens, 1988).

2.4 Rôle de transporteur du Cort

Au tout début, il fut généralement accepté que la CBG jouait un rôle passif dans la régulation des effets du Cort en modulant la disponibilité de la fraction libre de l'hormone pour les tissus (Brien, 1988). Étant donné le haut degré de dissociation existant entre la CBG et le Cort qui lui est lié, il semblait difficile de considérer l'entrée possible du complexe Cort/CBG au niveau de la membrane cellulaire. Seul le Cort non lié à la CBG, donc à l'état libre est considéré comme biologiquement actif (Brien, 1988). Normalement,

lorsque la concentration plasmatique de la CBG tend à varier, on observe un changement au niveau du Cort total qui s'effectue de façon parallèle maintenant ainsi les niveaux de Cort libre relativement stables. Par contre, dans le cas d'un choc septique, une diminution rapide de l'activité de la CBG dans le sérum est remarquée. Or, Savu et collègues (1981) ont émis l'hypothèse que certaines substances relâchées dans la circulation lors d'un choc septique peuvent causer une interférence dans la liaison du Cort par la CBG. D'autres raisons furent soulevées pour expliquer la baisse de la capacité de liaison de la CBG qui survient lors d'un choc septique. Celui-ci s'accompagne d'une diminution généralisée de la synthèse protéique par le foie, ce qui peut expliquer la baisse des niveaux du transporteur. De plus, le ratio CBG/albumine se trouve d'autant plus diminué en situation de choc septique, ceci suggère une inhibition spécifique de la production de CBG à ce moment (Pugeat *et al.*, 1989). Cette baisse mesurée lors de l'inflammation est causée par une diminution de l'expression hépatique du gène de la CBG (Faict *et al.*, 1983; Faict *et al.*, 1985). Finalement, une dégradation précipitée de la CBG dans le sérum augmente sa clairance rénale et provoque une chute des niveaux de la protéine dans la circulation. Hammond *et al.* (1987) ont démontré que clivage de la CBG par l'élastase, une serine protéase relâchée en grande quantité lors d'un choc septique jouait un rôle important dans la diminution de la concentration plasmatique de la CBG (Duswald *et al.*, 1985).

2.4.1 Pharmacocinétique de liaison entre la CBG et le Cort

La CBG possède une grande affinité pour les GC, principalement le Cort et le corticosterone (Ka = 7.9×10^{-8}) ainsi que pour la progestérone (Ka = 7.0×10^{-8}) (Ballard, 1979). Cette affinité est spécifique au GC ayant la plus forte activité biologique pour une espèce donnée. Ainsi, chez l'humain 90% de tout le Cort dans la circulation est lié à la CBG tandis que chez les rongeurs c'est 90% du corticosterone qui y est lié (Ballard, 1979). L'albumin lie 5% du Cort circulant dans le plasma. Toutefois, lorsque les concentrations de Cort dans le plasma augmentent, au delà de 500nmol/L, une proportion plus grande de l'hormone se trouve liée à l'albumine (Ballard, 1979). La dissociation du complexe stéroïde/CBG est influencée par la température. En effet, des essais ont

démontré qu'à 4°C le temps de dissociation $t_{½}$ = 247s et à 37°C de 0.79 s (Stroupe *et al.*, 1978).

2.4.2 Clivage de la protéine

La CBG ainsi que la TBG n'exerce aucune activité inhibitrice de sérine protéase. L'évolution a complètement adapté la structure de serpin caractérisant ces deux protéines en leur conférant un nouveau rôle de transporteur hormonal (Pemberton *et al.*, 1988). Il est difficile de comprendre pourquoi un changement aussi dramatique dans la fonction de la protéine et une structure tout aussi complexe seraient responsables du simple rôle de transport d'hormones. L'activité de serine protéase inhibitrice exercée par les serpins leur est conférée par une conformation native de type stressée les rendant vulnérable au clivage protéolytique. Or, cette structure particulière fut retenue pour le transport des hormones. La CBG native, sous la forme stressée, possède une poche qui permet la liaison du Cort. Les travaux de Pemberton *et al.* (1988) furent les premiers à se pencher sur le sujet. Ils démontrèrent le clivage de la protéine s'effectuant en seulement 5 minutes, lorsqu'en présence d'élastase provenant de neutrophiles humains. De plus, ils remarquèrent que ce clivage produisait 2 fragments peptidiques et s'accompagnait d'un perte importante d'affinité pour le Cort. Ils proposèrent alors un mécanisme pour le transport spécifique des glucocorticoïdes au niveau des sites inflammatoires. Leur théorie repose sur le fait qu'il s'effectue une transition entre les formes stressée et relaxée de la protéine résultant d'un clivage protéolytique survenant spécifiquement aux sites d'inflammation et permettant la libération de l'hormone et la modulation subséquente de la réponse inflammatoire.

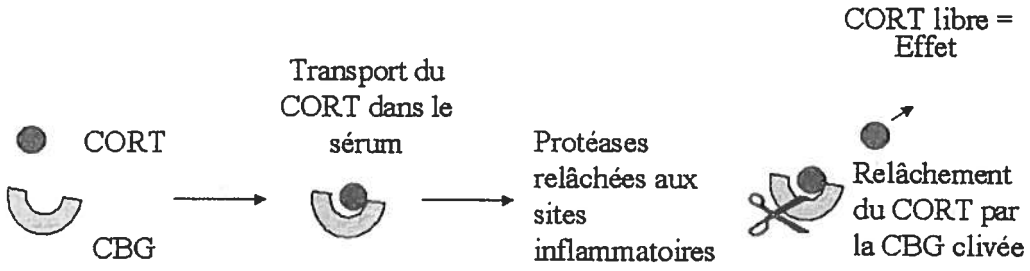


Figure 5 : Le transport du Cort aux sites inflammatoires (Pemberton *et al.*, 1988)

Toujours dans la même voie, Hammond *et al.* (1990) démontrèrent que le clivage s'effectuait entre les acides aminés 344 et 345. Conséquemment à celui-ci, il notèrent l'apparition de 3 fragments de 5, 10 et 11 kDa sur gel de SDS polyacrylamide. En fait, le fragment de 5 kDa produit suite au clivage de la CBG est la longueur du peptide en fonction du nombre d'a.a. qui le composent. Les fragments supplémentaires sont le résultat de la présence d'une chaîne glycosylée plus ou moins longue ancrée entre les a.a. 347 à 349 au niveau de la séquence consensus [Asn-X-Ser/Thr] qui constitue le dernier site propice à la N-glycosylation avant l'extrémité C-terminale de la protéine. De plus, ils notèrent que la présence de l'α1-inhibiteur de protéase (A1-PI), une protéine produite par les macrophages (Mornex *et al.*, 1986), de la même famille que la CBG, empêchait le clivage de celle-ci lorsque incubée en présence d'élastase. A1-PI exerce sont action anti-protéolytique en formant un complexe avec l'élastase, protégeant du même coup la CBG. Dans la circulation sanguine, un excès en A1-PI protégerait en permanence la CBG d'un clivage possible par l'élastase. Toutefois, l'activité inhibitrice sur l'élastase de A1-PI est modifiée au niveau des sites inflammatoires. En effet, la forte production en radicaux libres qui s'y effectue provoque l'oxydation d'une méthionine dans le site actif de liaison à l'élastase, empêchant ainsi la formation du complexe A1-P1/elastase. La protéase est libre d'attaquer la CBG, ce qui provoque une diminution capacité de liaison pour le Cort et conséquemment, le relâchement de l'hormone (Hammond *et al.*, 1990).

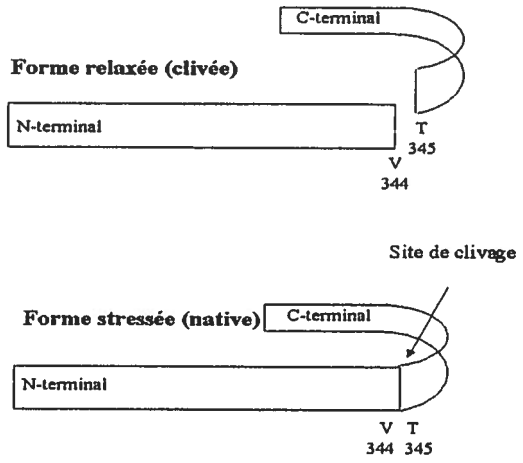


Figure 6 : Différentes formes de la CBG

2.4.3 Pathologies associées à une modulation de l'activité de la CBG

Les pathologies associées à une déficience du transport des GC sont extrêmement rares. Deux formes de la protéine furent maladroitement associées à une pathologie causée par une déficience en transcortine chez les humains. En effet, les niveaux de CBG observés dans ces deux situations sont normaux. Il faudrait plutôt parler d'une déficience dans le transport hormonal effectué par la protéine puisque ces deux formes expriment une affinité réduite pour le Cort. La première forme à être caractérisée fut la transcortine Leuven qui porte une substitution en position 93 de l'a.a. leucine pour un acide-aminé histidine (Van Baelen *et al.*, 1993). Plus récemment, la variante CBG Lyon fut décrite. C'est une substitution de l'a.a. aspartate en position 367 pour une asparagine qui causerait la baisse du transport de l'hormone. D'ailleurs, ce site est retrouvé dans la région carboxy-terminale de la CBG reconnue pour exercer le rôle de liaison au stéroïde (Emptoz-Bonneton *et al.*, 2000). Récemment, l'absence totale de CBG dans le sérum de patients provenant d'une même famille fut observée. C'est une mutation retrouvée dans le second exon qui est responsable de la présence prématurée d'un codon stop situé au niveau de l'a.a. 121. Les niveaux de Cort libre dans la circulation demeurent inchangés puisque une déficience en Cort total fut aussi observée (Torpy *et al.*, 2001).

3. Interactions entre les GC et le système immunitaire

Depuis le début des années 40, le système immunitaire est reconnu comme étant sensible à l'action des hormones GC. Il a été démontré que l'axe HPA pouvait réduire la réaction inflammatoire via la production de GC par le cortex surrénalien (Hench *et al.*, 1949). Des doses pharmacologiques de GC s'avèrent immunosuppressives sur presque tous les effecteurs de la réponse immunitaire qu'elle soit innée ou acquise, cellulaire ou humorale (Webster *et al.*, 2002). Les GC suppriment l'adhésion cellulaire, la migration, l'activation des macrophages, la présentation des Ag, l'expression du récepteur des cellules T (TcR), l'activation de même que la prolifération, la différentiation et les fonctions cytotoxiques des cellules T finalement, la production d'Ac par les cellules B (Almawi *et al.*, 2002).

Les effets des GC sur les effecteurs de l'immunité sont causés par l'interaction de cette hormone avec son récepteur cytosolique. Des études ont révélé que le nombre de ces récepteurs était de 3 à 4 fois élevé dans le thymus que dans la rate (Miller *et al.*, 1998). D'ailleurs, les lymphocytes T sont probablement les effecteurs de l'immunité les plus susceptibles à l'action des GC. Parmi ceux-ci, les thymocytes immatures du thymus sont particulièrement sensibles (Miller *et al.*, 1998). Des niveaux élevés de GC dans la circulation entraînent une atrophie du thymus et une baisse de la cellularité des ganglions mésentériques causées par l'apoptose de ces cellules. De nombreuses études établissent un rôle pour les GC dans la maturation des thymocytes. En contrepartie, les cellules T matures sont moins sujettes à l'apoptose causée par les GC (Webster *et al.*, 2002).

De récents travaux viennent jeter une nouvelle lumière sur le potentiel immunomudulateur des GC (Almawi *et al.*, 2002; Miyaura et Iwata, 2002) . En effet, au lieu de supprimer l'activité des cellules T, les GC provoquent un changement dans le patron de cytokines sécrétées en diminuant la production de médiateurs pro-inflammatoires, mais plutôt anti-inflammatoires. Ces profils peuvent être catégorisés en type TH1 ou TH2. Un patron de cytokines de type TH1 est caractérisé par la production d'IL-2 et d'IFN-γ et favorise la réponse immunitaire cellulaire (Miyaura et Iwata, 2002). Le patron de type TH2 est caractérisé par la production des cytokines IL-4 et IL-10 et est

associé à la réponse humorale via la production d'anticorps par les effecteurs du système immunitaire. À des concentrations physiologiques, les GC inhibent le profil TH1 et favorisent le profil TH2, d'où le caractère anti-inflammatoire des GC (Almawi *et al.*, 2002).

3.1 Le récepteur à glucocorticoïdes (GR)

Le GR est un membre de la famille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes au même titre que les récepteurs aux estrogènes, à la progestérone, aux mineralocorticoïdes ainsi qu'aux hormones thyroïdiennes et sa fonction de facteur de transcription est ligand-dépendante (Webster *et al.*, 2002). Ces récepteurs possèdent tous une structure similaire qui peut être caractérisée en 3 régions distinctes. Le domaine N-terminal est impliqué dans la transactivation; la région médiane, autrement appelée domaine de liaison à l'ADN, contient deux structures en doigts de zinc qui permettent la liaison à l'ADN; la partie C-terminale ou domaine de liaison avec le ligand est responsable de l'interaction avec l'hormone, de même qu'avec la protéine chaperonne « Heat shock protein » HSP90 et est aussi impliquée dans la dimérisation et la transactivation (Morishima *et al.*, 2000). Les GC circulent dans le plasma en association avec des protéines de transport, la CBG ou l'albumine. Tout porte à croire que les GC entrent dans la cellule via un mécanisme de diffusion passive. Une fois entré dans la cellule, le ligand peut venir lier son récepteur spécifique (Webster *et al.*, 2002).

Les effets des GC sont produits via leur interaction avec deux types de récepteurs cytoplasmiques soit les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR ou de type I) et les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR ou de type II) (Deak *et al.*, 1999). L'affinité du Cort pour le MR (KD = 0.5 - 1 nM) est plus grande que pour le GR (KD = 5 – 10 nM), ce qui implique une occupation plus importante du MR par le Cort sous des conditions basales (Deak *et al.*, 1999). Toutefois, dans certaines conditions de stress intense, l'expression différentielle des deux types de récepteurs peut être modifiée, ce qui amène une plus grande liaison des GC avec le GR (Deak *et al.*, 1999). De plus, l'expression de ces deux types de récepteurs est hétérogène parmi les divers tissus et cellules du système

immunitaire. Il fut observé que le thymus exprimait exclusivement du GR et ce, plus abondamment que n'importe quel autre organe du système immunitaire. Par ailleurs, la rate de même que les ganglions lymphatiques et les PBMC (cellules mononuclées périphériques du sang) expriment aussi bien le MR que le GR (Miller *et al.*, 1998). Cette hétérogénéité dans l'expression des deux récepteurs explique la sensibilité notable du thymus aux corticostéroïdes qui se traduit en une forte réduction de la cellularité suite à une exposition chronique à ce type d'hormones (Miller *et al.*, 1998). Le GR est essentiel à la survie. Un défaut génétique qui empêche la traduction normale du récepteur entraîne un retard dans le développement des poumons qui se traduit inévitablement par la mort du fœtus à la naissance (Schmid *et al.*, 1995).

3.1.1 Le complexe cytoplasmique du GR

Le GR est localisé dans le cytoplasme et forme un complexe multi-protéique inactif lorsque lié aux protéines chaperonnes de la famille HSP ainsi qu'aux immunophillines (Morishima *et al.,* 2000). La fonction principale de ce complexe est de permettre au récepteur d'acquérir une conformation permettant au ligand de s'y fixer. Il est constitué de 5 protéines différentes soit un dimère de HSP90 et un monomère de chacune des protéines suivantes HSP70, HSP40 (aussi appelé YDJ-1), (HSP organizer protein) Hop et p23. Seules les protéines HSP90 et 70 assemblées dans une stoechiométrie 2 :1 sont essentielles au bon repliement du GR. La protéine Hop agit comme une organisateur qui améliore l'association des protéine HSP90 et 70 entre-elles (Morishima *et al.*, 2000). L'assemblage des protéines HSP90 et 70 en un complexe permettant la liaison avec le GR se fait via un processus impliquant l'ATP. La protéine HSP70 possède une activité intrinsèque ATPase qui lui permet d'échanger une molécule d'ATP pour de l'ADP. Le rôle de la protéine HSP40 est de favoriser cette réaction. Ceci permet à la HSP70 d'obtenir une conformation possédant une forte affinité pour des substrats hydrophobes et l'assemblage du complexe multi-protéique. Tout comme la HSP70, la HSP90 possède un domaine de d'échange ATP/ADP qui régule sa conformation. La protéine p23 se lie à la forme ATP-liée de la HSP90 et la stabilise dans cette conformation, ce qui lui confère une meilleure affinité pour le ligand (Kanelakis *et al.*, 2002; Rajapandi *et al.*, 2000). Bref,

sans être essentielles à la formation du complexe de chaperonnes, les protéines Hop, HSP40 et p23 favorisent à leur manière cette réaction.

3.1.2 Le complexe transcriptionnel du GR

Suite à la liaison de l'hormone au GR, le récepteur se dissocie de son complexe et se transloque dans le noyau (Kohler *et al.*, 1997). La présence de 2 séquences NLS (nuclear localization signal), la première au niveau du domaine de liaison à l'ADN, la seconde près du domaine de liaison du ligand, dirigent le récepteur vers le noyau (Kohler *et al.*, 1997). C'est l'interaction entre ces séquences et certaines protéines telles que la karyopherin et l'importin-α qui permet l'ancrage du GR au complexe protéique formant le pore nucléaire (NPC) (Kohler *et al.*, 1997). La translocation du GR est effectuée via l'activité GTPase des protéines Ran/TC4 et pp10/NF2 associées au NPC (Kohler *et al.*, 1997). À ce moment, le GR homodimérise avec un second complexe ligand-récepteur. L'homodimerisation se produit lorsque les motifs en helice-10 présents au niveau de la partie N-terminale du domaine de liaison au ligand se lient entre-eux (Bledsoe *et al.*, 2002). Cette unité transcriptionnelle active se couple ensuite aux éléments de réponse aux GC (GRE) via l'interaction des motifs en doigts de zinc du domaine de liaison à l'ADN du GR et l'ADN. 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 (Robyr *et al.*, 2000). La liaison du GR à l'ADN provoque le recrutement de molécules co-activatrices comme la CREB-binding protein (CBP/p300) et le steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) (Robyr *et al.*, 2000). La CBP/p300 est une grosse protéine qui possède une activité histone acétyle transferase (HAT), c'est-à-dire qu'elle est en mesure de dérouler l'ADN des histones, rendant le gène plus accessible (Robyr *et al.*, 2000). Cette activité augmente grandement le pouvoir transcriptionnel du complexe et permet le recrutement de la RNA polymerase II et de médiateurs de la transcription. Parmi ceux-ci citons : la protéine d'interaction avec le GR (GRIP-1) qui augmente l'activité HAT, la TATA binding protein (TBP), les facteurs associés à la TBP (TAF) ainsi que les membres de la famille « Switch » (SWI) (Robyr *et al.*, 2000).

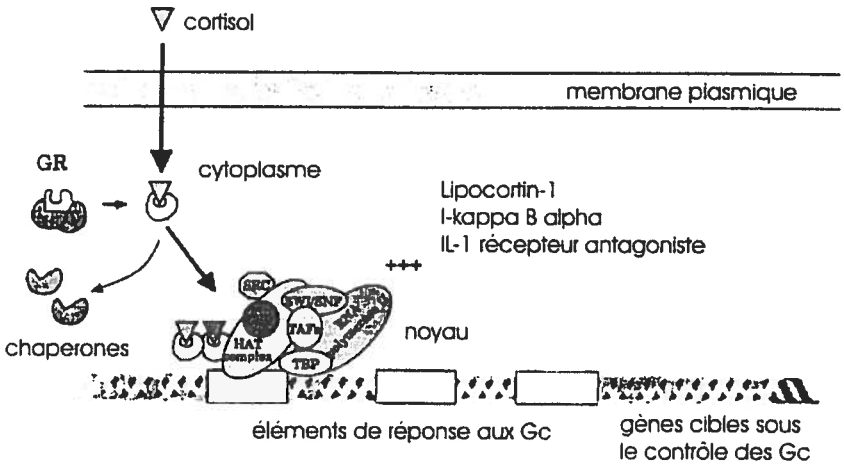


Figure 7 : Le complexe transcriptionnel du GR lié à l'ADN. La liaison de l'hormone GC à son récepteur provoque le détachement des protéines chaperones et la translocation du récepteur vers le noyau. Il s'en suit le recrutement des cofacteurs et la formation d'un complexe transcriptionnel actif. (inspiré de Adcock *et al.* 2000)

3.1.3 Mécanismes d'action des GC au niveau transcriptionnel

Les GC provoquent la transcription de certains gènes qui encodent pour des facteurs anti-inflammatoires tels que la lipocortin-1, le récepteur soluble de IL-1, l'inhibiteur de leucoprotéases du sérum de même qu'I-κBα (Adcock *et al.*, 2000). Toutefois, l'action anti-inflammatoire des GC est effectuée via l'inhibiton de la transcription des gènes activant la réponse inflammatoire et immunitaire. Pendant longtemps, on croyait que l'effet inhibiteur de GC se faisait via des éléments négatifs de réponse aux GC (nGRE) contenus dans les promoteurs de ces facteurs (Adcock *et al.*, 2000). Cependant, l'existence de ces derniers au niveau des gènes régulés négativement par les GC reste à démontrer. Les effets liés au GR se produisent généralement par une interaction protéine/protéine avec d'autres facteurs de transcriptions tels que AP-1, NF-κB de même que C/EBPβ, tous trois impliqués dans l'expression de gènes pro-inflammatoires (Webster *et al.*, 2002).

AP-1 est un facteur de transcription formé d'un homodimère ou d'hétérodimère des protéines c-Fos et c-Jun. Sa liaison au site AP-1 permet l'expression des gènes encodant

pour des cytokines telle que l'Il-2, l'IFN-γ et l'IL-1 (Adcock, 2000). L'effet inhibiteur du GR sur AP-1 est principalement causé par la formation d'hétérodimères GR/c-Fos, mais aussi par l'induction d'une protéine, GILZ (glucocorticoid induced leucine zipper) qui dimérise avec c-Jun et c-Fos et empêchent leur liaison à l'ADN (McKay et Cidlowski, 1999; Mittelstadt et Ashwell, 2001). AP-1 exerce son action en recrutant un complexe CBP (Adcock, 2000). Il fut démontré qu'un monomère de GR pouvait entrer en compétition pour la protéine CBP et diminuer le déroulement de l'ADN (Adcock, 2000). De plus, le GR peut recruter un complexe de désacétylation des histones (HDAC) qui viendra diminuer localement l'activité HAT du complexe CBP/p300 et ainsi réduire la transcription à partir de AP-1 (Ito et *al.*, 2000). Récemment, il fut prouvé que le GR était en mesure de réduire la phosphorylation de Jun au niveau de résidus Ser-63/73, donc d'inhiber l'activation de AP-1 en bloquant la cascade de signalement JNK (c-Jun NH2-terminal kinase) (Adcock, 2000).

Les GC peuvent aussi inhiber l'activité du facteur de transcription NF-κB (Mckay et Cidlowski, 1999). NF-κB est composé des protéines p65, C-Rel et Rel-B qui contiennent un domaine C-terminal de transactivation et des protéines p50 et p52 (NFκB2) qui possèdent un site d'interaction avec les membres de la famille I-κB (McKay et Cidlowski, 1999). Ainsi, NF-κB se trouve complexé dans le cytoplasme lorsque lié à la protéine inhibitrice I-κB. Suite à la liaison de certaines cytokines pro-inflammatoires à leur récepteur membranaire par exemple, le TNF-α et l'IL-1, I-κB devient phosphorylé, ubiquitiné et dirigé vers le protéasome pour y être dégradé (Almawi et Melemedjian, 2002) . Ceci libère NF-κB qui se transloque dans le noyau. Une fois dans le noyau, NF-κB initie la transcription des gènes de cytokines pro-inflammatoires. Deux écoles de pensées s'opposent quant aux effets répressifs des GC sur NF-κB. La première stipule que les GC induisent, via le GR, l'expression de la protéine I-κB qui séquestre NF-κB dans le cytoplasme et empêche sa translocation dans le noyau. Ce mécanisme fut particulièrement étudié au niveau des monocytes et des lymphocytes (Adcock, 2001).

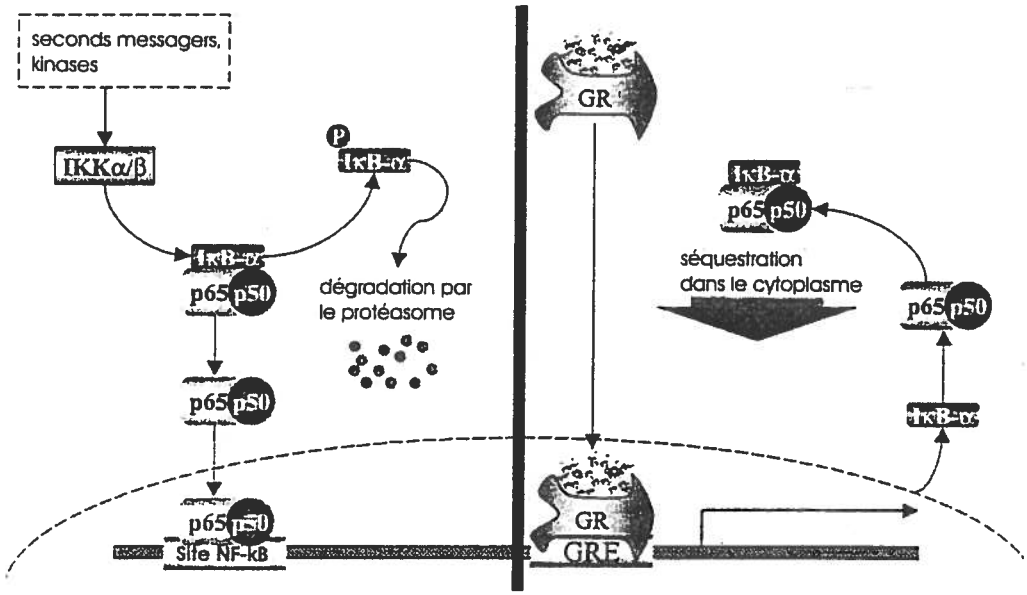


Figure 8 : Inhibition de l'activité transcriptionnelle de NF-κB par l'induction de I-κB. La liaison du complexe transcriptionnel du GR à la séquence GRE contenue dans le gène de IκB provoque la synthèse de la protéine qui se lie à NF-κB et le séquestre dans le cytoplasme. La phosphorylation de IκB empêche sa liaison à NF-κB (inspiré de Adcock, 2001)

Le second modèle suggère une interaction directe entre le GR et NF-κB. Une unité monomérique du GR se lie spécifiquement avec la sous-unité p65 du complexe NF-κB pour en inhiber sa liaison à l'ADN. La présence de deux a.a. localisés dans la partie C-terminale des motifs en doigts de zinc du GR est essentielle à la liaison de NF-κB. (Liden *et al.*, 1997). Aussi, le GR peut se lier à NF-κB sans empêcher l'interaction du facteur de transcription à l'ADN. Le GR s'associe à NF-κB au niveau du domaine de transactivation de p65 et empêche ainsi le recrutement de facteurs de transcriptions associés à la boîte TATA (TFII-D) (Almawi et Melemedjian, 2002).

Finalement, le GR pourrait entrer en compétition avec NF-κB dans le recrutement de co-activateurs tels que SRC-1 et CBP (Refojo *et al.*, 2001). Il fut démontré que le fait d'augmenter les niveaux de CBP et de SRC-1 rétablissait l'activité transcriptionnelle de NF-κB inhibée par le GR (Sheppard *et al.*, 1998).

3.1.4 La résistance aux GC: forme β du récepteur

Chez l'humain, le gène du GR encode pour deux isoformes du récepteur, α et β. La plus abondante et celle exprimée de manière ubiquitaire dans le cytoplasme des cellules du corps humain est la forme α. L'activité transcriptionnelle du GR lui est attribuée. Le GRβ constitue une forme tronquée du GRα, puisque les 50 derniers a.a. sont remplacés par une extrémité C-terminale qui ne compte que 15 a.a (Leung *et al.*, 1997). Ainsi, le GRβ ne lie aucun ligand et ne possède aucune activité transcriptionnelle. Toutefois, des essais de liaisons à l'ADN ont démontré une interaction entre le GRβ et les séquences GRE, donc une compétition possible entre les deux formes du récepteur. (Bamberger *et al.*, 1995). Plus tard, il fut démontré que la forme β du récepteur agissait en tant que dominant négatif en formant, avec le GRα, des hétérodimères transcriptionnellement inactifs (Oakley et al., 1996). On relia le phénomène de résistance aux GC observé dans le traitement de nombreuses pathologies inflammatoires à l'augmentation de l'expression du GRβ (Leung *et al.*, 1997; Hamid *et al.*, 1999; Christodoulopoulos *et al.*, 2000). Par la suite, il fut prouvé que le TNF-α et IL-1, deux cytokines pro-inflammatoires agissaient au niveau du gène du GR en augmentant préférentiellement l'expression de la forme β (Webster *et al.*, 2001).

3.2 Effets des GC sur les effecteurs de l'immunité

L'impact des GC sur les différents effecteurs du système immunitaire est très important et varie selon le type cellulaire. Ainsi, les GC empêchent la maturation, la migration, le relâchement de cytokines pro-inflammatoires de même que l'activité de phagocytose et l'apoptose de certains types cellulaires. Le tableau qui suit résume les effets des GC sur les principaux effecteurs de l'immunité.

Tableau 1 : Description des différents effets causés par les GC sur les principaux effecteurs de l'immunité.

Type cellulaire	Effets
Lymphocyte T immature	↑ apoptose des cellules doubles positives (Pazirandeh *et al.*, 2002) ↓ maturation (Lechner *et al.*, 2001)
Lymphocyte T mature	↓ de la production de cytokines pro-inflammatoires (Kovalovky et al., 2000) ↑ de la production de cytokines anti-inflammatoires (Kovalovky et al., 2000)
Lymphocyte B	↑ apoptose des précurseurs immatures (Lill-Elghanian *et al.*, 2002) ↑ apoptose des cellules matures (Perandones *et al.*, 1993) Modulation de la sécrétion des Ac : ↑ production IgE (Wu *et al.*, 1991)
Macrophage	↓ Relâchement de cytokines pro-inflammatoires : TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 (Joyce *et al*, 2001) ↓ Relâchement de NO (Maridonneau-Parini *et al.*, 1989) ↓ Relâchement de PGE_2 (Masferrer *et al.*, 1992)
PBMC (monocyte)	↑ Expression de Fas/Fas ligand, apoptose (Schmidt *et al.*, 2001) ↓ Relâchement de cytokines pro-inflammatoires : TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 (Joyce *et al*, 1997)
Granulocyte	↓ migration (Goulding *et al.*, 1998) ↓ phagocytose (Goulding *et al.*, 1998) ↑ survie cellulaire (Strickland *et al.*, 2001)
Cellule dendritique	↓ Maturation (baisse de l'expression du CD80, CD86) (Verhoeven *et al.*, 2000) ↓ de l'activité de présentation des Ag (Verhoeven *et al.*, 2000) ↑ apoptose (Brokaw *et al.*, 1998)
Cellule NK	↓ de l'activité de phagocytose (Gatti *et al.*, 1987)

3.2.1 Macrophages et monocytes

Parmi les effecteurs de la réponse inflammatoire sensibles à l'action inhibitrice des GC, se trouvent les monocytes/macrophages (Joyce *et al.*, 1997). L'effet principal des GC sur ces cellules est une diminution de la production des médiateurs de l'inflammation tels que : le TNF-α, IL-1β, IL-6 et IL-8 (Joyce *et al.*, 2001). Le contrôle qu'exercent les GC sur la sécrétion de TNF-α par les monocytes/macrophages est principalement relié à la diminution de l'activité des facteurs de transcription de la famille NF-κB (Adcock et al., 1997). Le promoteur du gène encodant pour le TNF-α ne contient aucun élément de réponse aux GC, mais comporte un site de liaison pour les facteurs de transcription NF-κB et AP-1 (Joyce *et al.*, 1997). L'inhibition de la liaison de ces facteurs à l'ADN est causée par une interaction entre le récepteur aux GC et la sous-unité Rel-A du complexe NF-κB de même que par l'induction de la synthèse de I-κB (Auphan *et al.*, 1995). De

plus, les GC sont reconnus pour diminuer l'expression en surface du CD14, un récepteur connu pour lier les LPS, de puissants inducteurs de la synthèse de TNF-α (Nockher et Scherberich, 1997).

Aussi, les GC inhibent la production de prostaglandines et d'oxyde nitreux (Maridonneau-Parini *et al.*, 1989; Masferrer *et al.*, 1992). Ces deux produits sont relâchés en grande quantité par des macrophages activés. In vivo, il fut observé que l'administration de GC diminuait l'activité de l'enzyme COX-2 chez des macrophages péritonéaux (Masferrer *et al.*, 1994). Cet effet est de nature post-transcriptionnelle et implique la diminution de la stabilité du plus court des deux transcrits primaires codant pour l'enzyme COX-2. Par ailleurs, il fut démontré que les GC pouvaient induire l'apoptose chez les monocytes en augmentant l'expression en surface des marqueurs CD95 et CD95L (Fas et Fas ligand) impliqués dans une cascade entraînant l'activation des caspases 3 et 8 et la mort de la cellule (Schmidt *et al.* 2001).

3.2.2 Granulocytes

Les granulocytes (basophiles, éosinophiles et neutrophiles) sont des cellules de l'immunité non spécifique et les premières cellules recrutées aux sites inflammatoires. Ces cellules exercent un potentiel pro-inflammatoire puissant et sont impliquées dans diverses réactions allergiques et maladies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde et la bronchite chronique (Goulding *et al.*, 1998). Les neutrophiles sont attirés aux sites inflammatoires en réponse à divers signaux chemotactiques générés localement. Ces signaux incluent les facteurs du complément, principalement le C5a, les molécules d'origine microbienne (LPS) mais aussi diverses chemokines par exemple, l'IL-8 (Goulding *et al.*, 1998). Un neutrophile activé est un puissant inducteur de la réponse inflammatoire. L'effet est produit via le relâchement de diverses cytokines, chemokines et facteurs de croissance tels IL-1, IL-6 et le TNF-α, IL-8 et MIP-1α et finalement le facteur stimulant les colonies de macrophages (M-CSF) et G-CSF (Goulding *et al.*, 1998).

L'action inhibitrice des GC sur le neutrophile est vaste. Celle-ci implique une baisse de la migration, de l'expression de molécules d'adhésion, de l'extravasation et l'inhibition de la phagocytose (Van Wetering *et al.*, 2002). De plus, les GC empêchent le relâchement de médiateurs pro-inflammatoires. Il fut démontré que les GC inhibaient la sécrétion de défensines, des peptides qui favorisent la sécrétion d'Il-8 par les cellules épithéliales (Van Wetering *et al.*, 2002).

Paradoxalement, tout en inhibant l'activité pro-inflammatoire des neutrophiles, les GC favorisent la survie de ces derniers. Cet effet semble être causé par l'augmentation de l'expression de la forme β du GR. De plus, il fut démontré que l'IL-8 pouvait agir en synergie avec les GC en augmentant le ratio GRβ/GRα, favorisant du même coup la survie de ces cellules (Strickland *et al.*, 2001).

3.3 Action des GC sur les cellules T

Vers 1920, il fut observé qu'une surrénalectomie (ablation des glandes surrénales) s'accompagnait d'une hypertrophie du thymus (Sapolsky *et al.*, 2000). Cette situation établissait pour la première fois un lien entre les systèmes immunitaire et neuroendocrinien en démontrant que les niveaux circulants de GC avaient un effet sur le thymus. Les recherches dans les décennies suivantes ont permis d'établir que l'action des GC était directement lié à une perturbation de la maturation des lymphocytes T (Webster *et al.*, 2002). De plus, une action directe des GC sur la différentiation des cellules T en cellules effectrices a été démontrée. Dans les sections suivantes, nous verrons l'action des GC au niveau de la différentiation et la mort des cellules T.

3.3.1 La maturation des thymocytes

Le thymus joue un rôle clé dans la différentiation et la sélection des cellules T fonctionnelles. Les cellules qui se différencient en cellules T matures dérivent toutes de précurseurs hématopoïétiques issus du foie fétal ou de la moelle osseuse qui migrent vers le thymus attirés par certains facteurs (Imhof *et al.*, 1988). La thymotaxin, un peptide de

11 kDa produit par les cellules épithéliales du thymus fut identifiée comme un puissant chemo-attractant exclusif aux précurseurs des cellules T (Imhof *et al.*, 1988). L'analyse structurale de cette molécule permit de découvrir qu'elle était identique à une protéine déjà connue, la β_2-microglobulin, une des chaînes constituant le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe 1 (Dargemont *et al.*, 1989). De plus, différentes études ont permis de montrer la production dans le thymus de diverses chemokines incluant : la protéine inflammatoire de macrophage (MIP-2), le facteur dérivé des cellules stromales (SDF-1), la MIP-1α, MIP-1β et MIP-1γ ainsi que les chemokines relatives à l'activation (TARC) et à l'expression dans le thymus (TECK) (Wilkinson *et al.*, 1999). Par ailleurs, les thymocytes immatures possèdent les récepteurs CCR4, CCR5, CCR7, CCR8 et CCR9 qui leurs permettent de lier les facteurs énoncés précédemment (Norment *et al.*, 2000). Ces récepteurs semblent être couplés aux protéines G puisque la colonisation du thymus fut contrée par la toxine pertussique, un inhibiteur du signalement des récepteurs à chemokines (Norment *et al.*, 2000).

Les cellules qui pénètrent dans le thymus possèdent à leur surface le marquer Thy-1+, mais n'expriment ni les chaînes formant le récepteur des cellules T (TcR), ni les molécules de co-stimulation $CD4^+$ et $CD8^+$ (Wada *et al.*, 1996). Ces cellules sont dîtes doubles-négatives (DN) et logent principalement dans la partie sous-capsulaire de l'organe. Le stade DN est caractérisé par l'expression différentielle des marqueurs de surface CD25 et CD44 (Janeway et Travers, 1997). Ainsi, 4 stades, allant de DN1 à DN4 se succèdent, le dernier est atteint lorsqu'une cellule n'exprime ni l'un, ni l'autre de ces deux marqueurs de surface. Les thymocytes immatures, 97% d'entres-eux sont caractérisés par l'expression en surface du marqueur CD24 ou « heat stable antigen (HSA) » et la perte de celui-ci est un événement qui marque la maturation des cellules et précède leur migration vers la périphérie (Wilson *et al.*, 1988). La maturation d'une cellule T se déroule en différentes étapes successives et implique la migration des cellules à travers l'organe, de la zone sous-capsulaire au cortex et finalement à la médulla (Janeway et Travers, 1997). Le mouvement des cellules dans le thymus est assuré par l'expression à la surface des thymocytes immatures de molécules d'adhésion et d'intégrines telles que: ICAM-1, CD18, CD2/LFA-3 et CD44 (Wada *et al.*, 1996; Barda-

Saad *et al.*, 1999). De plus, l'expression de la cadhérine-E, une protéine impliquée dans l'adhésion des cellules, exprimée à la surface des thymocytes immatures et de l'épithélium du thymus, semble jouer un rôle important dans la transition des cellules de la zone sous-capsulaire au cortex (Lee *et al.*, 1994). L'expression à la surface des fibroblastes contenus dans la médulla de la protéine SDF-1 et de son récepteur CXCR-4 à la surface des thymocytes immatures (DN) permettrait leur passage à travers la membrane cortico-medullaire, les dirigeant ainsi vers la médulla pour y poursuivre leur développement (Suzuki *et al.*, 1999).

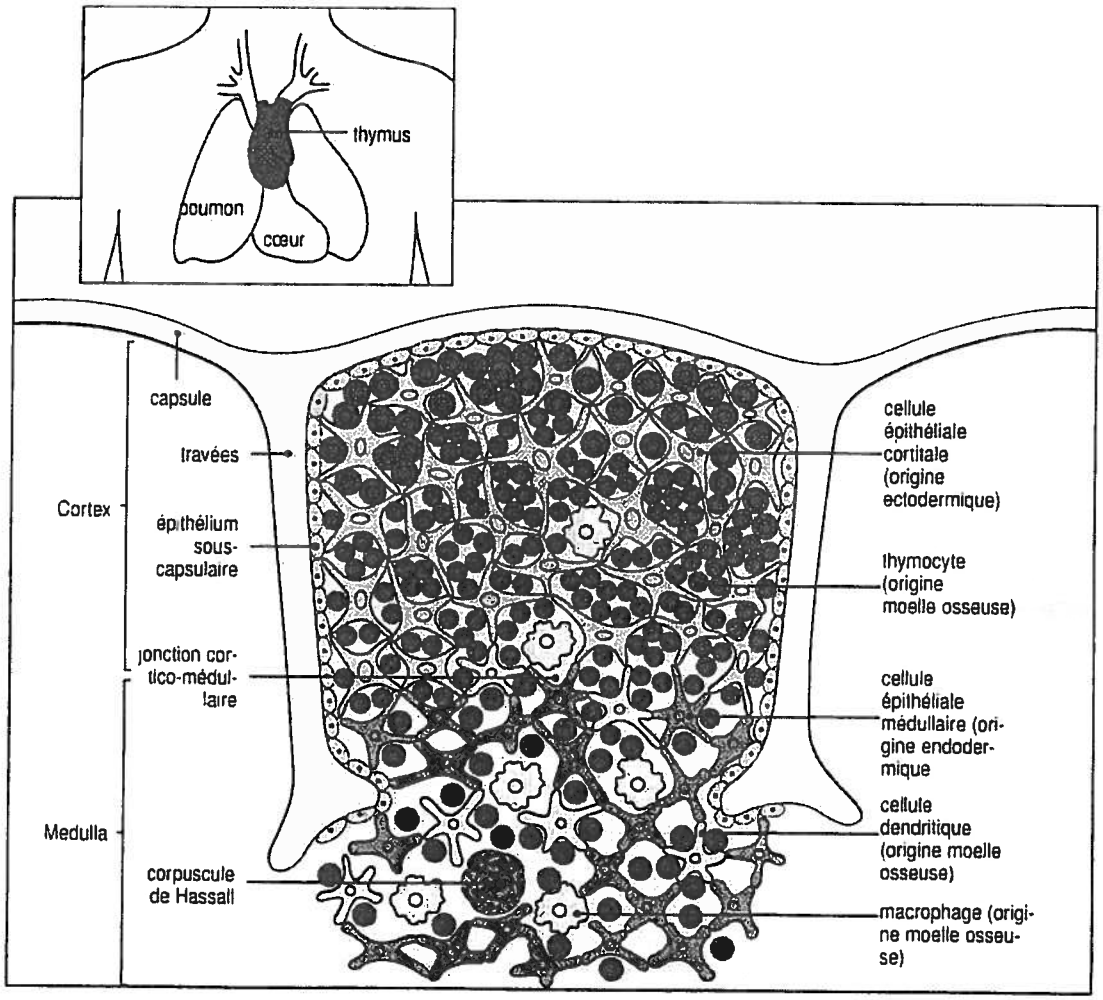


Figure 9 : Structure du thymus (tiré de Janeway et Travers, 1997)

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 présentés par les molécules

du CMH du soi, et d'éliminer les cellules auto-réactives, c'est-à-dire celles qui démontreraient une activité particulière pour des antigènes du soi (Vacchio et Ashwell, 2000). Ce processus est constitué de multiples étapes rigoureuses de sélection. La diversité du répertoire est assurée par le réarrangement des gènes V, D et J qui lorsque joints par un processus d'épissage alternatif, encodent les chaînes formant le TcR (Vacchio et Ashwell, 2000). Près de la moitié des cellules DN ne réussiront pas à réarranger leurs gènes de telle sorte que le nouveau cadre de lecture permettent l'expression à la surface d'un TcRβ fonctionnel (Ashwell *et al.*, 2000). L'élimination de cellules non-fonctionnelles est assurée par un processus appelé β-sélection et s'effectue selon un mécanisme de mort par apoptose impliquant notamment l'activité pro-apoptotique de la protéine P53 (Costello *et al.*, 2000).

Pour progresser au delà de la β-sélection, les thymocytes doivent être en mesure de former et d'activer un complexe pre-TcR. Celui-ci est composé des chaînes accessoires γ, δ, ε, et de l'homodimère ζ-ζ qui s'associent pour former le complexe CD3. Cette étape est cruciale dans la progression de la cellule au stade de double-positivité (DP) caractérisé par la co-expression des chaînes du $CD4^+$ et $CD8^+$ (Shinkai *et al.*, 1993). Les facteurs de transcription de la famille EGR (Early Growth Response) notamment EGR1, 2 et 3, jouent un rôle essentiel dans le développement des thymocytes puisqu'en inhibant ceux-ci on bloque la passage du stade DN au stade DP (Carleton *et al.*, 2002). C'est durant ce stade que les cellules prolifèrent rapidement et entament leur processus de réarrangement des gènes associés à l'expression en surface de la chaîne α du TcR.

Alors, s'amorce un processus rigoureux de sélection qui empêche la progression de la maturation des cellules T non-fonctionnelles ou potentiellement dommageables pour l'organisme. Les thymocytes sont triés selon leur habilité à réagir avec le complexe formé d'un peptide présenté par les molécules du CMH du soi exprimés à la surface des cellules stromales du thymus (Janeway et Travers, 1997). Les cellules possédant un TcR ne reconnaissant pas le CMH du soi, sont dépourvues de toute utilité et meurent par « négligeance » selon un mécanisme apoptotique impliquant la voie mitochondriale (Vacchio et Ashwell, 2000). L'apoptose mitochondriale est régit par l'équilibre des

protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-Xl et pro-apoptotique telle que Bax, qui s'insèrent dans la membrane mitochondriale et en régulent la sortie du cytochrome C dans le cytoplasme (Zhang et *al.*, 2000). Le cytochrome C sera intégré aux protéines Apaf-1 formant un complexe pro-apoptotique actif appelé apoptosome. Ce complexe est reconnu pour procéder au clivage des caspases (Matsuki et *al.*, 2002). À l'autre extrême, les thymocytes qui expriment un TcR de forte avidité pour un peptide du soi présenté par les molécules du CMH sont éliminés via un processus apoptotique impliquant l'activation du TcR (sélection négative) (Vacchio et Ashwell, 2000). Le signalement intracellulaire induit par la liaison du TcR au complexe CMH/peptide du soi nécessite l'activité de phosphorylation du proto-oncogène Lck sur les motifs « ITAMs » retrouvés principalement sur les chaînes du CD3 associées à la portion intracellulaire du TcR (Janeway et Travers, 1997). La mort par apoptose de ces cellules serait causée par l'activation de la protéine kinase C (PKC) (Asada *et al.*, 2000).

Par ailleurs, seuls les thymocytes qui portent un TcR reconnaissant avec une avidité faible à modérée le complexe CMH/peptide du soi subissent une sélection positive. Les autres cellules qui expriment un récepteur avec une avidité très faible ou très forte pour le CMH du soi ou qui n'ont pas réussi à réarranger leurs gènes du TcR sont dirigées en apoptose (Ashwell *et al.*, 2000). Les mécanismes intracellulaires causant la survie des thymocytes nécessitent l'expression du CD28 à la surface de ces cellules de même que les signalements via les voies (extracellular related kinase) ERK et celle des (mitogen activated protein) Ras/MAPkinases et l'augmentation de l'expression de certains facteurs de survie par exemple, Bcl-2 (McKean *et al.*, 2001).

Une variété de marqueurs caractérisent les cellules matures. Chez la souris, une forte expression du marqueur Qa.2 est remarquée à la surface des cellules les plus matures, prêtes à émigrer vers la périphérie (Pénit et Vasseur, 1997). L'acquisition de ce marqueur se fait au delà des étapes de sélections, lorsque les cellules atteignent la médulla. Elles y résident pendant 7 jours avant d'être exportées vers la périphérie (Tian *et al.*, 2001).

3.3.2 Rôle des GC dans le thymus

L'importance des GC dans l'équilibre de la mort ou de la survie des thymocytes lors de leur maturation demeure un sujet litigieux. Cependant, certains faits nous font croire que les GC ont un rôle à jouer dans le développement des thymocytes. 1) Les cellules épithéliales du thymus possèdent un caractère stéroïdogénique (Vacchio *et al.*, 1994). 2) Les thymocytes sont particulièrement sensibles à l'apoptose provoquée par les GC (Pazirandeh *et al.*, 1999). 3) L'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse de stéroïdes augmente le délétion des thymocytes lorsque stimulés par l'engagement de leur TcR (Vacchio et Ashwell, 2000). 4) Des souris transgéniques qui expriment un transcrit anti-sens rendant impossible la synthèse du GR possèdent un thymus atrophié causé par la déplétion sélective des cellules DP (King *et al.*, 1995). Ces cellules deviennent particulièrement sensibles à l'apoptose lorsque stimulés via l'engagement du TcR (King *et al.*, 1995). Le contraire est aussi vrai. 5) L'effet délétère des GC sur les thymocytes DP fut démontré chez des souris transgéniques surrexprimant le gène du GR dont le promoteur était sous le contrôle de la p56Lck. Ces cellules entraient en apoptose via l'engagement du TcR (Pazirandeh *et al.*, 2002).

En contre partie, certaines études affichent des résultats controversés sur le rôle exact des GC dans la maturation des thymocytes. Le développement normal du répertoire de lymphocytes T fut démontré chez des souris déficientes en GR (Purton *et al.*, 2000). Aussi, il semble que le rôle des cellules épithéliales du thymus dans la production de GC soit lui aussi contesté. Les travaux de Jenkinson *et al.*, (1999) viennent en contradiction avec des études citées précédemment. Ils démontrèrent l'expression des enzymes stéroïdogéniques non pas au niveau du tissu épithélial, mais plutôt chez les thymocytes DP prêt à subir la sélection positive. Quoiqu'il en soit, l'idée de l'antagonisme mutuel fut évoquée pour expliquer le rôle des GC au niveau de la maturation des thymocytes. Il semble que les GC inhibent le signalement intracellulaire provoqué par l'engagement du TcR lors de la sélection positive en créant une fenêtre de sélection où seuls les thymocytes portant une TcR qui réagit avec une avidité moyenne pour le complexe

Ag/CMH du soi, peuvent poursuivre leur maturation (Vacchio et Ashwell, 1997; Vacchio *et al.*, 1999).

3.3.2.1 Production de GC dans le thymus

La synthèse locale de pregnenolone et de deoxycorticosterone remarquée dans le thymus de souris ouvrit la voie à des études plus poussées qui démontrèrent la présence de certaines enzymes responsables de la synthèse des GC exclusivement sur les cellules épithéliales qui tapissent et soutiennent l'organe (Vacchio *et al.*, 1994). Ces enzymes contenues dans les mitochondries des cellules épithéliales du thymus furent définies comme étant la 11α-hydroxylase (P450scc), la 21-hydroxylase (P450c21) et la 11β-HSD1 (P450c11β) (Pazirandeh *et al.* 1999, Lechner *et al.*, 2000). De même, la présence de ce lot d'enzymes fut démontré chez le poulet. Cette découverte vint renforcer l'idée que la production locale de GC au niveau du thymus joue un rôle dans la maturation des thymocytes (Lechner *et al.*, 2001).

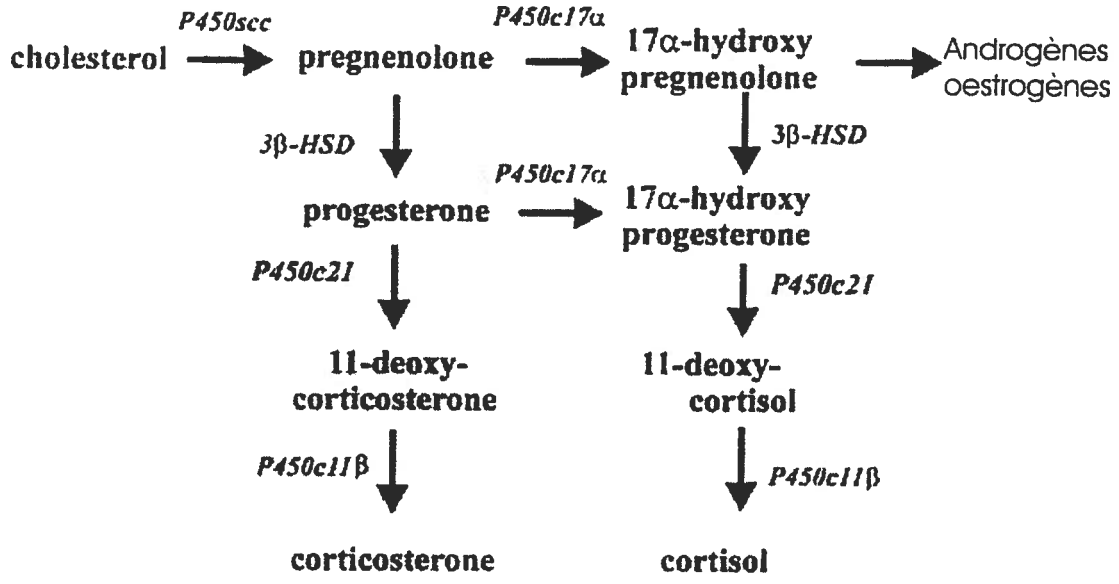


Figure 10 : Voies enzymatiques de la synthèse des stéroïdes

3.3.2.2 Mécanisme d'action des GC sur la maturation des thymocytes

Les mécanismes à travers lesquels les GC régulent la sélection positive des thymocytes demeurent à ce jour inconnus. Le développement des cellules T est inhérent au signalement induit par le TcR. Les GC atténuent ce signalement en diminuant la phosphorylation des chaînes ζ associées au complexe CD3, de ZAP-70 et de LAT (Van Laethem *et al.*, 2001). Cette baisse de la phosphorylation n'est pas causée par une diminution de l'activité kinase, mais plutôt par un défaut dans la localisation de ces molécules à la membrane plasmique (Van Laethem *et al.*, 2001). Le mécanisme par lequel les GC modulent ce transit demeure inconnu.

La sensibilité des thymocytes aux GC de même que l'expression du GR diffèrent à travers les différentes sous-populations du thymus. Il fut démontré que l'expression du GR était forte au stade DN, diminuait grandement au stade DP et augmentait au niveau des cellules matures (Berki *et al.*, 2002). L'augmentation du GR au stade DN semble suivre la hausse de l'expression en surface du CD25. Le signalement à partir du complexe pré-TcR semble causer la diminution de l'expression du GR observé au stade DP. Par ailleurs, la sensibilité aux GC est inversement proportionnelle à l'expression du GR puisque les cellules DP s'avèrent être les plus susceptibles à la mort induite par les GC (Brewer *et al.*, 2002a).

3.4 Effet des GC sur les cellules T matures

Les effets des GC sur les cellules lymphoïdes sont multiples et incluent l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, la mort cellulaire programmée des cellules pré-B, des cellules T matures retrouvées en périphérie ainsi que de nombreuses lignées cellulaires leucémiques (Planey et Litwack, 2000). L'activité des cellules T nécessite l'expression coordonnée de nombreuses molécules dont l'IL-2 et le récepteur à l'IL-2 (Janeway et Travers, 1997). Les GC sont reconnus pour perturber le signalement à partir du récepteur à l'IL-2. Récemment, il fut démontré que les GC favorisaient l'expression de la protéine GILZ (glucocorticoid induced leucine zipper) (Mittelstadt et Ashwell, 2001). Celle-ci forme un

complexe avec NF-κB en s'associant aussi bien avec les sous-unité p65 et p52 et inhibe par le fait même, la liaison à l'ADN du facteur de transcription. En fait, GILZ se complexe à NF-κB dans le cytoplasme et diminue sa translocation dans le noyau (Ayroldi *et al.*, 2001).

3.4.1 Différentiation des cellules T CD4$^+$ en Th1 vs Th2

Lorsque stimulées, les cellules T CD4$^+$ se différencient en cellule T auxilliaire (Th), Th1 ou Th2, chacune exprimant un profil de cytokines et une activité qui leur est propre (Janeway et Travers, 1997). Les cellules Th1 sont caractérisées par l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que INF-γ, l'IL-2 et le TNF-β (Kovalovsky *et al.*, 2000). Les cellules de type Th2 sont caractérisées par la production de cytokines anti-inflammatoires telles que IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 provoquant la différentiation des cellules B et la production d'Ac contre les pathogènes . Le contrôle du profil de sécrétion de cytokines par les cellules T est effectué par le type de cellules présentatrices d'antigènes (CPA), la force de signalement du TcR avec l'antigène qui lui est présenté, de même que la présence des cytokines dans l'environnement (Kovalovsky *et al.*, 2000). En effet, la maturation des cellules Th2 est favorisée par l'IL-1 et l'IL-12 tandis que l'IFN-γ.

Les GC ciblent principalement les monocytes/macrophages plutôt que la cellule T pour l'induction d'un phénotype Th2. Les GC inhibent la production de l'IL-1 par les macrophages et stimulent celle du récepteur soluble à l'IL-1 un antagoniste du signalement de cette cytokine (Kovalovsky *et al*, 1998). L'expression différentielle du récepteur à l'IL-1 à la surface des cellules Th1 et Th2 a été démontré comme déterminant dans le développement des cellules Th1. (Almawi *et al.*, 2002). De plus, en bloquant préférentiellement la synthèse de IL-12 par les monocytes et macrophages, les GC induisent un phénotype Th2. Les cellules de type Th1 expriment le récepteur à l'IL-12 tandis qu'il n'est pas retrouvé à la surface des cellules de type Th2. L'inhibition de la synthèse de l'IL-12 par les GC implique l'action du GR sur l'état de phosphorylation de la protéine Stat4 nécessaire au signalement qui découle de la liaison de l'IL-12 à son récepteur (Hasko et Szabo, 1999). De plus, les GC diminuent l'expression en surface des

chaînes β1 et β2 du récepteur à IL-12. Le mode d'action des GC sur la répression de la synthèse de l'IL-12 est relié à l'inhibition de la liaison de NF-κB au promoteur du gène (Hasko et Szabo, 1999).

Par ailleurs, le profil de cytokines produites par les cellules $CD8^+$ est aussi influencé par les GC. Il fut démontré qu'un traitement de ces cellules avec du Dex provoquait une augmentation de la production d'IL-10 ainsi qu'une inhibition de la synthèse d'IL-4, IL-5 et IL-13. Cet effet nécessite la présence d'IL-4 de même que celle des CPA. L'augmentation de la synthèse de l'IL-10 en présence de GC serait relié à la présence d'une séquence GRE au niveau du promoteur du gène de cette cytokine. Conséquemment, la production d'IL-10 dans le milieu causa une diminution de l'expression du récepteur à l'IL-2 de même que l'inhibition de la production d'IFN-γ (Richards *et al.* 2000).

4. Réponse de l'organisme au stress de la brûlure

Les blessures par brûlures sévères sont associées avec un débalancement général du sytème endocrinien et la production d'hormones de stress par les glandes surrénales (Matsui *et al.*, 1991). De plus, l'altération des fonctions du système immunitaire fut remarquée chez des patients gravement brûlés. Une relation directe fut établie entre l'étendue de la brûlure et la sévérité de l'immunosuppression chez le patient (Gianotti *et al.*, 1993). Suite à une brûlure sévère, la peau subit d'énormes dommages et n'est plus en mesure d'exercer son rôle de barrière protectrice. De plus, l'intégrité de la membrane gastro-intestinale est touchée. Cette situation met en péril notre co-existence avec divers micro-organismes qui nous entourent. Lorsque ces bactéries pénètrent notre système il s'ensuit une réponse inflammatoire de type local. Toutefois, si cette réponse n'arrête pas l'infiltration microbienne, il y aura une colonisation successive des systèmes curculatoires et lymphatiques. Une réponse inflammatoire systémique se développera alors, engageant simultanément les défenses humorales et cellulaires du système immunitaire. Des observations ont permis de relier le taux de mortalité à l'aire de la surface brûlée (Berry et *al.*, 1982). Par ailleurs, une seconde corrélation fut notée entre l'étendue de la zone brûlée et la chute des fonctions relatives à l'activité des cellules T (Munster et Gressitt, 1973)

4.1 Physiologie de la brûlure

La brûlure sévère entraîne une réponse métabolique de type biphasique. Durant les premiers jours suivant le traumatisme, on observe une diminution du volume sanguin, une diminution de la perfusion des tissus situés en périphérie de même qu'une faible consommation d'oxygène. Cette phase d'une durée de 10 jours précède celle plus longue qui 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 (Tredget et Yu, 1992; Wolfe *et al.*, 1989). L'énergie provient principalement du glucose. Toutefois, la demande est telle que rapidement la concentration plasmatique en sucre n'est pas suffisante pour répondre à la demande. Le foie procède alors à la

gluconéogénèse, soit la production de glucose via l'utilisation des acides gras et a.a. Le tissu musculaire constitue le principal réservoir d'a.a. dans l'organisme. Les GC de même que les cytokines pro-inflammatoires TNF-α et IL-1 sont les principaux médiateurs responsables de la protéolyse musculaire (Hasselgren, 2000).

La concentration plasmatique en protéines est modifiée suite à une brûlure sévère ou en situation d'infection. La fraction des protéines dont la concentration plasmatique augmente en réponse aux traumatismes sont dites de phase aigüe. Cette classe de protéine comprend la protéine réactive-C, l'alpha-1 glycoprotéine, le fibrinogène. Parallèment, la chûte des niveaux de nombreuses protéines est observée en situation de traumatismes. C'est le cas notamment de l'albumine, la transferrin, la pré-albumine et la protéine de liaison au rétinol (Sevaljevic *et al.*, 1989). Les principaux facteurs stimulant la synthèse des protéines de phase aigües sont des médiateurs relâchés par les leucocytes activés : l'IL-1 et le facteur stimulant des hépatocytes (HSF). Paradoxalement, même si la CBG fait partie de la même classe de protéine que l'alpha-1 glycoprotéine, sa synthèse semble être diminuée en situation de brûlure sévère (Wolfe *et al.*, 1989).

L'intégrité de la barrière gastro-intestinale est sévèrement touchée lors d'un traumatisme. Normalement, le tractus gastro-intestinal est efficace pour retenir les microorganismes. Cette barrière est formée de trois composantes. La première est constitué d'une barrière physique, la muqueuse intestinale. La seconde est une barrière immunologique et cellulaire formée des entérocytes, des plaques de Peyer et des IgA sécrétoires. Finalement, la flore microbienne endogène au tractus maintient les populations potentiellement pathogènes à des niveaux sécuritaires (Epstein *et al.* 1992). La brûlure sévère augmente la perméabilité de la barrière gastro-intestinale. Il fut observé que l'infection des plaies des patients brûlés était causée par la translocation de bactéries présentes dans la flore gastro-intestinales et non via une colonisation de l'environnement extérieur. De plus, une relation fut démontrée entre l'étendue de la brûlure et le deGRé de perméabilité de la barrière gastro-intestinale (Ryan *et al.*, 1992). Il semble que la génération de radicaux libres par les neutrophiles et entérocytes modifient l'intégrité de la

muqueuse intestinale permettant aux bactéries de se transloquer dans la circulation sanguine (Koike *et al.*, 1993).

La peau brûlée constitue en elle-même, un danger potentiel de mort. Suite à une brûlure elle devient hautement toxique (Allgower *et al.*, 1973). Des études ont révélé qu'une greffe de peau brûlée à des souris provoquait la mort de ces dernières tandis qu'une simple barrière de gelée de pétrole appliquée sous le greffon protégeait les souris. L'injection d'un homogénat de peau brûlée dans la cavité péritonéale de souris provoquait la mort de celles-ci. La caractérisation des protéines se retrouvant dans l'homogénat de peau brûlée a permis d'identifier un complexe de lipides/protéines (LPC) formé de l'association de 6 protéines ayant un poids compris entre 40 et 160 kDa. Ces protéines furent identifiées comme faisant partie de la famille des protéines de choc thermique (HSP). Les lymphocytes T semblent être une cible pour ces protéines puisqu'ils possèdent des récepteurs permettant de les lier (Sparkes, 1997).

4.1.1 Changements au niveau endocrinien

La brûlure sévère provoque une réponse endocrinienne qui influence la production de presque toutes les hormones connues à ce jour. Cette réponse est complexe et varie grandement d'un individu à un autre. Elle est généralement caractérisée par une importante production d'hormones de stress, de catécholamines, de l'arginine-vasopressin (AVP), de CRH, et une baisse marquée de la production des hormones de croissance et sexuelles. (Matsui *et al.*, 1991). De plus, une forte corrélation positive ou négative existe entre l'étendue de la brûlure et la concentration plasmatique de ces hormones (Smith *et al.*, 1997). L'AVP contrôle la pression sanguine en agissant sur la rétention d'eau dans la circulation sanguine. De plus, l'AVP et le CRH agissent en synergie pour augmenter le relâchement d'ACTH par l'hypophyse. Il fut assumé que la production globale des hormones issus des glandes surrénales était contrôlé via le relâchement d'ACTH par l'hypophyse (Murton *et al.*, 1998). Toutefois, la production de Cort ne semble pas être directement reliée à une hausse de la concentration plasmatique d'ACTH puisque les niveaux de cette hormone mesurés après une brûlure sévère sont souvent variables ou

demeurent constants (Vaughan *et al.*, 1982). Donc, d'autres facteurs viennent directement stimuler la porduction de Cort par les glandes surrénales. L'augmentation de la production de Cort est visible dès le premier jour suivant la brûlure et sa concentration demeure élevée dans la circulation des patients brûlés pour une durée pouvant aller jusqu'à 60 jours. D'ailleurs, le patron de sécrétion des glandes surrénales est affecté par la brûlure. En temps normal, le sulfate de dihydroepiandrosterone (DHEA-S) est le produit principal des glandes surrénales. Toutefois, en situation de traumatisme sévère, on remarque une baisse des niveaux de cette hormone dans la circulation et une augmentation rapide et soutenue de la concentration plasmatique de Cort (Parker et Baxter, 1985).

4.1.2 La réponse du système immunitaire

Le déficit immunologique observé chez les patients brûlés a été longuement attribué à une réduction du nombre, mais aussi de l'activité des lymphocytes T, à l'augmentation de l'activité de cellules T suppressives, à la présence dans le sérum de facteurs suppressifs ainsi qu'à une modulation de la synthèse de certaines cytokines et de l'expression de leurs récepteurs spécifiques. Diverses études ont démontré une altération des populations lymphocytaires suite à une brûlure sévère. En effet, des niveaux réduits en lymphocytes totaux circulants de même que résidents au niveau du thymus, de la rate et des ganglions furent mesurés et ce, pour une période de 48 à 60 jours post-brûlure. Ces changements affectent autant les sous-populations $CD4^+$ que $CD8^+$ (Barlow *et al.*, 1994).

Une conséquence importante de la réponse de l'hôte lors d'une brûlure sévère est l'hyper production, principalement par les macrophages, des métabolites dérivés de l'acide arachidonique (i.e. prostaglandines, leukotriènes, thromboxanes) reconnus pour être de puissants immunomodulateurs. L'activité des lymphocytes T est particulièrement touchée par les médiateurs relâchés lors de la brûlure. En effet, la prostaglandine E_2 (PGE_2) agit au niveau des cellules T en diminuant leur capacité à proliférer suite à une stimulation avec de l'IL-2. Les effets suppressifs de PGE_2 sur les cellules T semblent être reliés à une élévation du niveau d'AMPc intracellulaire (Schwacha *et al.*, 1999). Par ailleurs, une

augmentation de la concentration en IL-2, IL-1 et du récepteur soluble à l'IL-2 fut remarquée dans la circulation. Paradoxalement, les cellules T de patients brûlés sont incapables de répondre à une stimulation générée par l'IL-2. Il semble que la brûlure favorise la production par les cellules $CD4^+$ naïves de cytokines de type Th1 telles que l'IL-2 et l'IFN-γ, mais empêche l'activation des cellules $CD4^+$ effectrices, c'est-à-dire celles stimulées par la liaison d'un Ag au récepteur des cellules T (TcR). Cette situation provoque une augmentation de « l'activation-induced cell-death » (AICD) donc, la mort cellulaire des lymphocytes T lorsque stimulés (Teodorczyk-Injeyan *et al.*, 1995).

L'atrophie du thymus fut observée 24 heures suite à une brûlure sévère. Il semble que l'augmentation de l'expression du TNF-α au niveau de l'organe provoque l'apoptose des thymocytes via la liaison de la cytokine au récepteur à TNF (Cho *et al.*, 2001). Parallèlement, les GC jouent un rôle dans l'immunusuppression du système immunitaire suite à une brûlure sévère en induisant l'apoptose des cellules. En effet, il fut observé une augmentation de l'activité de la caspase-3 au niveau du thymus et de la rate, 3 heures après la traumatisme ce qui provoque une atrophie des organes, plus forte au niveau du thymus. Par ailleurs, les GC provoquent l'augmentation de l'expression du Fas ligand au niveau des cellules des plaques de Peyer et des lymphocytes intra-épithéliaux retrouvés à l'interface du tractus gastro-intestinal ce qui affecte particulièrement les lymphocytes B et les lymphocytes $CD4^+$ (Fukuzuka *et al.*, 2000b)

4.2 Influence des opiacés sur la réponse immunitaire et la régulation des GC

Le traitement de la douleur chez les patients gravement brûlés implique l'utilisation de substances opiacés, principalement des composés analogues à la morphine. Une bonne compréhension de l'impact de ces substances sur la réponse associée au stress et celle du système immunitaire est d'une importance capitale chez ces derniers. La prochaine section étudiera plus en détails le contrôle qu'exercent les opiacés sur les systèmes endocrinien et immunitaire et analysera plus particulièrement les effets produits par la buprenorphine.

4.2.1 Opiacés et système immunitaire

Le lien existant entre les drogues opiacées et le système immunitaire fut révélé lorsque des médecins remarquèrent, chez leurs patients héroïnomanes, une susceptibilité accrue aux maladies infectieuses. Il fut démontré chez ces derniers que leurs PBMC répondaient faiblement à une stimulation produite par un agent mitogénique (Brown *et al.*, 1974). Depuis, différentes études menées aussi bien *in vitro* que *in vivo* aboutirent toutes à une même et unique conclusion : certains opiacés, administrés à des concentrations pharmacologiques, suppriment les effecteurs cellulaires de la réponse immunitaire. Cette situation crée, chez des patients gravement brûlés, un malencontreux dilemme. En effet, il faut d'un côté que le traitement analgésique soulage le patient des souffrances que lui causent ses blessures et d'un autre côté, que ce traitement n'ait pas ou peu de répercussions sur le système immunitaire.

L'étroitesse du lien qui unit l'effet des opiacés aux diverses cellules du système immunitaire fut confirmée par la découvertes de récepteurs aux opiacés à la surface de presque tous les effecteurs de l'immunité (McDonough *et al.*, 1980). Dès lors, on s'intéressa à démontrer les effets de nombreux opiacés sur les cellules du système immunitaire. La majorité des travaux menés en ce sens ont révélé le caractère immunusuppresseur de la morphine.

In vitro, des études ont démontré que la morphine possédait une action immunosuppressive sur les fonctions des monocytes et des macrophages telles que: la flambée oxydative, l'activité de phagocytose et la formation de colonies à partir de cellules souches issues de la rate. Les travaux de Peterson *et al.* (1987a) ont rapporté une diminution de la production de peroxyde (H_2O_2) par les PBMC suite à une stimulation avec du zymosan ou du PMA, deux inducteurs de la flambée oxydative. Ils ont d'ailleurs remarqué qu'une substance produite par les lymphocytes, était responsable de la baisse d'activité des PBMC. C'est dans le cadre de travaux complémentaires que Peterson *et al.* (1987b) identifièrent ce facteur. Ils remarquèrent une diminution de la production d'IFN-γ par les lymphocytes du sang stimulés avec de la Con-A et cultivés en présence de

morphine. Cette cytokine est un puissant inducteur de la flambée oxydative chez les monocytes et les macrophages. Donc, la morphine agit au niveau des lymphocytes pour inhiber le phénomène de flambée oxydative observé chez les PBMC. Par ailleurs, les travaux de Rojavin *et al.* (1993) permirent d'affirmer que la morphine diminuait l'activité de phagocytose (pourcentage de cellules phagocytaires) ainsi que l'index de phagocytose (quantité de cellules ingérées par les phagocytes) chez des macrophages issus de la cavité péritonéale. Ils observèrent des résultats similaires en comparant l'effet in vivo de celui in vitro. Par ailleurs, l'effet de la morphine sur la formation de colonies à partir de cellules issues de la moëlle osseuse fut étudié par Roy *et al.* (1991). Leurs travaux démontrèrent aussi bien in vitro que in vivo l'effet inhibiteur de la drogue sur la formation de colonies à partir de cellules souches misent en culture avec du M-CSF. Donc, la morphine a un impact sur la génération de macrophages et leur activité.

Tableau 2 : Description des différents effets causés par la morphine sur les principaux effecteurs de l'immunité.

Type cellulaire	Effets
Lymphocyte T	↓ de l'expression du récepteur à IL-2 (CD25) (Gomez-Flores et Weber, 1999) ↓ de la production d'IL-2 (Gomez-Flores et Weber, 1999) ↓ de la prolifération induite par Con-A (Gomez-Flores et Weber, 2000) ↓ de la production IFN-γ (Peterson *et al.*, 1987)
Lymphocyte B	↓ de la production d'Ac spécifiques (Yanaura *et al.*, 1993) ↓ de la prolifération induite par une stimulation avec des LPS (Bryant *et al.*, 1988)
Macrophage	↑ de la production d'oxyde nitreux (Lu *et al.*, 1996) ↑ de la production de TNF-α (Roy *et al.*, 1999) ↑ de la production de IL-1β (Roy *et al.*, 1999) ↑ de la production de IL-12 (Roy *et al.*, 1999) ↓ de la production de IL-10 (Roy *et al.*, 1999) ↓ de la chemotaxie (Rojavin *et al.*, 1993) ↓ de la phagocytose (Rojavin *et al.*, 1993)
PBMC (monocytes)	↓ de la flambée oxydative (Welters *et al.*, 2000a) ↓ de la chemotaxie (Welters *et al.*, 2000a) ↑ de la production d'oxyde nitreux (Welters *et al.*, 2000b)
PMN	↑ de la production d'oxyde nitreux (Welters *et al.*, 2000a) ↓ de l'expression du récepteur Fc gamma (Miyagi *et al.*, 2000) ↓ de l'expression du récepteur du complément (Welters *et al.*, 2000)
Cellule NK	↓ de l'activité cytotoxique (Shavit *et al.*, 1997)

4.2.2 Opiacés et axe hypotalamo-hypophysaire surrénalien

L'administration de morphine intracérébroventriculairement (ICV) donc, directement au niveau du cerveau, est reconnue pour activer l'axe HPA (Freier et Fuchs, 1994). On dénote, dans certaines zones du système nerveux central (SNC), la présence importante de récepteurs aux opiacés, principalement, au niveau de l'hypothalamus, dans la substance grise péri-épendymaire du mésencéphale (PAG).

Suite à des expériences comparatives démontrant les effets d'une surrénalectomie et l'utilisation de RU-486, un inhibiteur du récepteur à GC, Bryant *et al.* (1991) émirent l'hypothèse que l'activation des glandes surrénales était un événement important dans l'immunosuppression associée à la morphine. Freier et Fuchs, (1994) prouvèrent que l'administration de morphine chez une souris provoquait une augmentation de l'activité de l'axe HPA et donc, une plus grande production de Cort. Conjointement à cette observation, ils observèrent une réduction de l'activité cytolytique des cellules NK renversée par l'utilisation de RU-486. Flores *et al.* (1995) démontrèrent que la lymphopénie (baisse marquée du nombre de lymphocytes) dans le sang observée suite à l'administration aiguë de morphine était inhibée totalement chez des rats qui avaient préalablement subi une surrénalectomie.

Ensuite, les travaux de Zubelewicz *et al.* (1999) déterminèrent que l'injection de morphine directement au niveau de l'hypothalamus provoquait l'augmentation des niveaux d'IL-6 dans le sang et du nombre de récepteurs à IL-6 au niveau de l'hypophyse, ceci entraînant une hausse marquée de la concentration de Cort plasmatique. Les travaux de Gomez-Flores et Weber, (1999) confirmèrent l'impact de l'axe HPA dans les divers effets reliées à l'utilisation de la morphine. Ils observèrent qu'une injection de l'opiacé directement au niveau du PAG affectait la fonction des lymphocytes et des cellules NK contenus dans la rate. Ils observèrent une baisse marquée de la production d'IL-2 par les lymphocytes associée à une diminution de l'expression du récepteur à IL-2 (CD25). Ils notèrent une importante réduction de l'activité cytolytique des cellules NK et une déplétion des capacités proliférives des lymphocytes suite à une stimulation avec un agent mitogénique. Parallèlement, Wang *et al.* (2002) ont démontré l'élévation

comparable des niveaux de Cort chez des souris injectées avec du Cort ou de la morphine. Tout en observant des effets immunosuppressifs similaires chez les deux groupes : atrophie de la rate et du thymus, diminution de la prolifération des lymphocytes, inhibition de la synthèse d'IL-2, activation de la synthèse de NO par les macrophages; certains effets furent retrouvés uniquement chez des souris traitées avec la morphine : production de TNF-α et IL-1β. Ces effets étaient complètement abolis chez des souris MORKO ou lorsque fut utilisé un inhibiteur des récepteurs nicotiniques du cerveau. Bref, cette dernière étude confirma le rôle que joue le Cort, mais suggéra aussi l'implication du système nerveux sympathique (SNS) dans l'immunosuppression reliée à la morphine.

4.2.3 Régulation de la CBG par la morphine

Quelques études ont démontré l'influence de la morphine sur les niveaux de CBG dans l'organisme. La morphine provoque chez le rat, une augmentation des niveaux plasmatiques de CBG et ce, de manière dose-dépendante (Nock *et al.*, 1997). Cet effet est relié au sexe de l'animal puisque le changement observé au niveau de la concentration en CBG est exclusif aux rats mâles et ne fut pas mesuré chez les rats femelles (Nock *et al.*, 1998). Une dernière étude de la même équipe précise l'importance des androgènes dans l'augmentation des niveaux de CBG causée par la morphine (Nock *et al.*, 2000)

4.3 La buprénorphine : une alternative à la morphine

La buprénorphine (Bup) est une drogue opiacée semie-synthétique dérivée de la thébaine. Elle est utilisée principalement dans le traitement de la douleur faisant suite à une blessure, un traumatisme sévère, une opération chirurgicale et plus récemment comme un substitut à la méthadone lorsque employée pour réduire la consommation de drogues chez des individus aux prises avec une dépendance physique aux opiacés (Gomez-Flores et Weber, 2000).

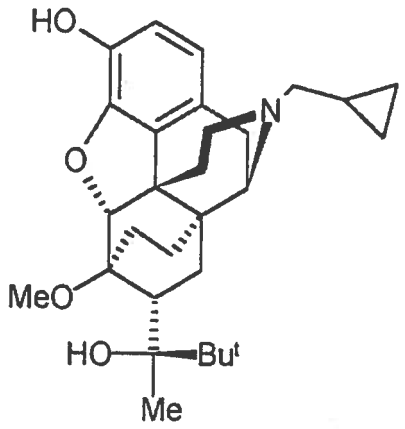


Figure 12: Structure chimique de la Buprénorphine

La Bup exerce une activité mixte, c'est-à-dire qu'elle agit en tant qu'agoniste ou antagoniste, lorsque utilisée en conjonction avec d'autres drogues de la même famille, sur l'activité des récepteurs aux opiacés Mu (μ) et Kappa (κ), pour lesquels elle possède une forte affinité (Kaiwara M *et al.* 1986; Kamei J. *et al.* 1997). Son profil pharmacologique est déterminé principalement par son agonisme partiel et une cinétique plutôt lente pour le récepteur μ (Martin *et al.*, 1976). Son activité intrinsèque est telle, que dans quasi n'importe qu'elle situation clinique, la Bup est aussi efficace sinon plus que la morphine et ce, tout en ayant une durée d'action considérablement prolongée. Cette caractéristique lui vient du fait qu'elle possède des propriétés analgésiques en moyenne, 30 fois plus puissantes que la morphine. (Cowan *et al.*, 1977). La Bup ne cause qu'une dépendance physique légère dont la durée du sevrage s'étale sur une courte période de temps. (Kobayashi *et al.*, 1998).

4.3.1 Effets de la buprénorphine sur la réponse neuro-endocrinienne au stress

La première étude qui démontra l'effet de la drogue sur le système endocrinien fut conduite par Moore *et al.* (1981). Ils montrèrent chez des patients, utilisant pendant et post-chirurgicalement de la Bup comme analgésique, une chute du cortisol plasmatique malgré le stress provoqué par la manipulation chirurgicale. Le même effet sur la diminution des niveaux de cortisol fut observé par Rolandi *et al.*, (1983) de même que par Pende *et al.*, (1986). Ces derniers relevèrent une augmentation de la production de Prl et

d'hormone de croissance (GH), dénotant ainsi une stimulation de l'hypophyse. Pechnick *et al.*, (1985) précisèrent l'action de la Bup sur le production d'hormones par l'hypophyse. Ils démontrèrent qu'une faible concentration de la drogue était suffisante pour induire la sécrétion de Prl, mais insuffisante pour augmenter la production de GH, tandis qu'une forte concentration causait des effets contraires sur le relâchement des deux hormones par l'hypophyse. L'explication de la différence qui existe dans la production de ces deux hormones réside dans le fait qu'elle implique une action directe de la drogue sur des récepteurs aux opiacés distincts pour a synthèse de l'une ou l'autre de ces hormones.

4.3.2 Effets de la buprénorphine sur la réponse immunitaire

Contrairement à la morphine, peu d'information traitant des effets de la Bup sur les différents effecteurs de l'immunité, nous est disponible à ce jour. La première étude exhaustive menée à ce sujet ne démontra qu'un faible effet de la drogue sur le système immunitaire. Les seuls changements observés furent pour la dose la plus élevée soit (1.6 mg/kg) ce qui équivaut à 10 fois la dose administrée normalement à un animal. Van Loveren *et al.*, (1994) étudièrent l'impact de 3 concentrations croissantes de Bup administrées à des rats sur une période de 4 semaines. Ils remarquèrent une augmentation du poids du thymus et des ganglions mésentériques, sans changements au niveau du poids de la rate. De plus, même pour la dose la plus élevée, il n'y eut aucun impact de la drogue sur l'activité cytotoxique des cellules NK ainsi que la capacité de prolifération des splénocytes. En ce qui concerne la concentration en Ac dans le sang, ils observèrent une diminution de la quantité de IgA et des niveaux normaux d'IgE et d'IgM. Les travaux de Banarjee et Sarkar, (1997), rapportèrent que l'administration quotidienne de Bup pendant une période de 60 jours à des souris causait une sévère leucopénie ainsi que la réduction du nombre de lymphocytes et monocytes et s'accompagnait d'une augmentation des neutrophiles dans la circulation. Toutefois, ces effets ne furent observés que très tard dans le traitement et sont visiblement reliés au stress infligé aux animaux.

Par ailleurs, les deux études les plus complètes menées à ce jour, concernant l'impact de la Bup sur différents paramètres de la réponse immunitaire furent celles de (Gomez-

Flores et Weber, 2000; Jobin *et al.*, 2000). La première étudia l'effet d'une unique administration de la drogue et ce, comparativement à l'utilisation de morphine, soit 3 heures après une injection directement au niveau de l'hypothalamus. La seconde se pencha sur l'impact de l'administration chronique de la drogue, principalement sur l'importance relative et la fonction des sous-populations cellulaires de la rate. Par opposition aux effets immunosuppresseurs attribués à la morphine, la Bup administrée de manière aiguë ne causa pas de changements au niveau de : l'activité cytotoxique des cellules NK de la rate, la prolifération des cellules T de la rate et du thymus en réponse à une simulation via la Con-A ou l'anti-TcR, la production d'Il-2 par les ces mêmes cellules ainsi que l'activité des macrophages soit, la production de NO, de TNF-α et l'action de phagocytose. Dans la seconde étude, ils mesurèrent à différents intervalles de temps et ce, jusqu'au 14e jour, l'effet de la Bup sur les splénocytes. Ils ne notèrent aucuns effets négatifs de la drogue sur la distribution des sous-populations de lymphocytes T de la rate ($CD4^{+}$, $CD8^{+}$, $CD4^{+}/CD8^{+}$), ni sur la prolifération des splénocytes induite par la Con-A ou l'anti-TcR. Toutefois, ils remarquèrent une stimulation de cette même prolifération se produisant entre les 4e et 7e jours d'administration de la drogue.

À ce jour, l'immunosuppression causée par les opiacés semble être reliée en premier lieu, à l'activation du SNS et au relâchement conséquent de catécholamines au niveau des organes primaires du système immunitaire et en second lieu, à l'activation de l'axe HPA et la production de Cort. L'administration de Bup ne semble pas causer d'effets négatifs sur le système immunitaire puisqu'elle n'influence pas relâchement de facteurs de stress tels que les glucocorticoïdes ou les catécholamines.

Deuxième partie

Articles scientifiques

1. Article # 1 : EFFECTS OF BUPRENORPHINE ON IMMUNE AND ENDOCRINE RESPONSE FOLLOWING CHRONIC EXPOSURE IN MALE MICE.

1.1 Résumé français de l'article # 1

Effets conjoints de l'administration chronique de buprenorphine à des souris mâles sur les réponses immunitaire et endocrinienne.

Michele D'Elia, Julie Patenaude, Dominique R. Garrel et Jaques Bernier

Les soins apportés aux patients traumatisés, gravement brûlés, sont d'une importance capitale, car ils augmentent leurs chances de survie et facilitent leur réhabilitation. Le soulagement de la douleur via des composés analgésiques se veut une pratique essentielle dans le traitement des blessures et diminue grandement le temps de séjour en milieu hospitalier. L'utilisation de ces drogues ne se fait pas sans effets secondaires. En effet, de nombreuses études ont démontré le caractère immunosuppressif de la morphine. L'action de la drogue se fait via les récepteur Mu présents à la surface des lymphocytes T, macrophages, cellules NK. Dans le contexte d'une brûlure sévère, il devient primordial de maintenir à un niveau optimal les défenses de l'organisme pour ainsi éviter les risques d'infections et de septicémie. Par ailleurs, d'autres drogues peuvent être utilisées pour amoindrir les effets de la douleur. La buprénorphine (Bup) est un dérivé semi-synthétique de la thébaïne donc, un opiacé au même titre que la morphine toutefois, aux propriétés anti-douleur 30 fois plus puissantes. Or, il n'existe que peu de d'études dans la littérature nous renseignant sur les effets secondaires de cette substance, lorsque administrée de manière chronique, sur les systèmes immunitaire et endocrinien. C'est dans cette optique, que nous avons voulu vérifier les effets de la Bup sur l'activité de l'axe HPA en dosant la quantité de Cort total et libre ainsi que la production, la concentration et la capacité de liaison de la CBG dans le sérum de souris exposées à la drogue. Les résultats de cette étude démontrent que la Bup administrée de manière chronique pendant une période de 10 jours n'affecte pas négativement les cellules du système immunitaire et ne module que légèrement et de manière transitoire la production de Cort, les niveaux de Cort libre sans

affecter la production et la stabilité de la CBG. Ces travaux nous permettent donc de conclure que la Bup serait un bon candidat dans le traitement de la douleur chez des patients gravement brûlés puisque ce composé est exempt des effets secondaires immunosuppressifs attribués à la morphine.

1.2 Article # 1

No detrimental effect from chronic exposure to buprenorphine on Corticosteroid-Binding Globulin and cortico-sensitive immune parameters

D'Elia M[1], Patenaude J[1], Hamelin C[1], Garrel DR[2], Bernier J[1].

[1] INRS-Institut Armand-Frappier, Pointe-Claire, PQ, H9R 1G6, Canada [2] ,Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-Hôtel-Dieu, Centre des grands brûlés, Montréal, PQ, Canada.

Running title: Safe use of buprenorphine on CBG/Cort regulation

Key words: Buprenorphine, Immune system, Corticosterone, Thymus, Spleen, Corticosteroid-binding globulin, CBG.

Address for correspondence and reprint requests:

Jacques Bernier, PhD

INRS-Institut Armand Frappier

245 Blvd Hymus, Pointe-Claire, Québec

Canada , H9R 1G6

e-mail: jacques.bernier@inrs-IAF.uquebec.ca

Tél.: (514) 630-8813

Fax: (514) 630-8850

Abstract

Opioid drugs reportedly regulate the immune system via their effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. The present study was carried out to assess the effects of chronic exposure to buprenorphine on HPA axis activation, corticosteroid-binding globulin (CBG), the main glucocorticoid (GC) carrier, and the immune system. Results show that buprenorphine, delivered by osmotic pump subcutaneously in C57BL/6 male mice during a 10-day period, caused a marked decrease in total corticosterone (CORT) levels at day 1 of exposure. CORT levels then increased with maximal values observed at day 5 of exposure. After day 5, total CORT levels gradually decreased and returned to control values. No significant changes were observed in CBG protein levels and mRNA expression in the liver. Since CBG levels remained unchanged, % free CORT values in buprenorphine mice did not differ from control values. Thus, the variations observed in the amount of free CORT were related only to changes measured in total CORT. These endocrine changes did not have a significant impact on the immune parameters measured. Total CD4+ and CD8+ splenic and thymic populations were not modulated by buprenorphine. However, splenocytes from mice exposed to buprenorphine after 5 days exhibited greater proliferation upon anti-TCR monoclonal antibody stimulation than saline-exposed mice. These results indicate that buprenorphine can be safely used because it did not have significant effects on GC availability for immune cortico-sensitive cells.

Introduction

Buprenorphine is a semi-synthetic derivative of thebaine used primarily in the management of severe pain following injury, surgical procedures, traumas, and recently as a substitute to methadone to reduce opiate consumption in individuals physically dependant on opiates (1). Buprenorphine is an opiate with mixed agonist and antagonist activity (2,3). Its analgesic effects are 30 times more potent than those of morphine and it produces little physical dependence (4).

Opioid agonists are known to modulate the immune system by either a direct action on opioid receptors in the target cells, or by an indirect, centrally-mediated pathway by binding to opioid receptors within the central nervous system (CNS) (5,6). Direct action on immune cells was established in vitro (7,8). Opioid receptors expressed by immune cells include μ^3 and δ isoforms (7) . Although ligand binding studies confirm the presence of morphine receptors on immune cells, the pattern of expression and biological effects in vitro do not explain the in vivo biological action (8). Morphine modulates innate and adaptive immunity in vivo, and it is possible that a combined indirect action can explain the biological effects. Indeed, it has been demonstrated that morphine induces thymocyte apoptosis in vivo but not in vitro, suggesting a minor receptor-mediated action (9). Thymus hypoplasia was shown to be glucocorticoid (GC)-dependent (10). GC-dependent effects of morphine are mediated via the CNS, which activates the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis (11). The activation of the HPA-axis results in production of GC, which are potent immunomodulatory hormones (12,13). Controversial effects of

opioids on HPA axis have been reported (14). Acute vs chronic exposure to the opiod drug has been suggested as a possible explanation for divergent results reported (13). Acute exposure has a sympathetic system-mediated effect, while chronic exposure induces the HPA-axis-mediated modulation.

One interesting observation after chronic exposure to morphine is the decrease of biologically active CORT (15). This decrease in active CORT is associated with an increase of corticosteroid-binding globulin (CBG) (16), that binds 80-90% of the hormone (17). Since only free hormone is biologically active, a variation in CBG binding of CORT can result in a rapid change in free hormone concentration, and therefore alter its tissue availability and biological effects on the immune system (18).

Few studies have examined the effect of chronic exposure to buprenorphine on GC or on the immune system, and those have been limited almost entirely to effects on hormone levels in blood following an acute exposure to buprenorphine. A single administration of buprenorphine has no adverse effects on immune parameters such as natural killer cell activity, macrophage phagocytosis and T-cell mitogenic or cell-mediated immune responses (1,19). On the other hand, no effect on the HPA-axis has been observed following a single dose administration (20).

In the present study, we examined the effects of chronic exposure to buprenorphine in adult male mice, on CORT (total and free), CBG levels, immune populations from the thymus, and spleen and T-cell proliferation. Overall, we observed that chronic exposure

to buprenorphine for 10 days had no negative effects on immune cells, nor did it affect CORT production, free-levels of CORT or the stability and production of CBG.

Materials and methods

Animals

All experiments were performed on 6 week-old male mice : C57BL/6 (Charles River Laboratories, St-Constant, Qc, 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 5 mice. Standard chow (Richmond standard lab diet, Lab Diet, Richmond, IN) 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.

Alzet Microosmotic Pump

Micro-osmotic pumps were installed as described previously (21). On day 0 of the experiment, mice were anaesthetized with Isoflurane gas (CDMV, St-Hyacinthe, Qc, Canada) and the upper sternal region of each mouse was shaved. Animals were randomly assigned to a control saline group or buprenorphine group, each group containing five animals per day of experiment. Alzet micro-osmotic pumps (Durcet Corp. Cuprentino, Ca. USA) were inserted subcutaneously by an incision made on the upper sternal skin and pushed carefully down to the peritoneal cavity. Surgical sutures were used to close the wound. All animals survived the procedures. Control group mice received a 0.9% saline-filled pump and buprenorphine-treated mice received a pump delivering 0.1 ml/kg of buprenorphine (Reckitt and Coleman Pharmaceuticals, Richmond, Va) per 12 h. For a

20g mouse, this is equivalent to 2.0 μg/12h of buprenorphine (0.2mg/kg body weight/day). This dose of buprenorphine is optimal for relief of pain (21,22). The delivery of buprenorphine by the pumps was determined indirectly 12h later by the ability of mu receptor agonist drugs to potentiate pentobarbital-induced hypothermia (23).

Sacrifice and Organ Preparation

On days 1, 5 and 10 after treatment, the animals were anaesthetized with Isoflurane and killed by cardiac puncture. Peripheral blood was collected in a heparinized coated tube and kept on ice. Plasma was collected after centrifugation and kept at –20 °C. Livers were frozen immediately in liquid nitrogen and kept at –80 °C until assays were performed. Thymus and spleen were removed and prepared immediately for study.

Preparation of Immune Cell Suspensions

Spleen and thymus were prepared individually as single-cell suspensions by teasing apart the matrix in Hank's balanced salt solution (HBSS, Sigma-Aldrich, Oakville, Ont. Canada). The suspensions were washed three times in HBSS and the spleen cells depleted of red blood cells by osmotic shock in Gey's solution supplemented with NH_4Cl, 0.155 M. The cells were resuspended in RPMI 1640 medium (Biomedia, Drummundville, Qc, Canada) supplemented with 50 μM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Oakville, Ont. Canada), 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Biomedia), and antibiotic solution (100 IU/ml penicillin and 100 μg/mL streptomycin (Biosource, Montreal, Qc, Canada). Cell viability was determined by trypan blue exclusion and was consistently greater than 90%.

Proliferative Response assay

Spleen cells (2 x 10^5 viable cells/well) were plated in triplicate in 96-well flat-bottom tissue culture plates (Sarsted, Montreal, Qc) previously coated with anti-TcR mAb H-57-597 (H-57,1μg/mL) (21). Plates were incubated at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 for 72 hr and pulsed for 4 hours with 10μg/well of MTT (methylthiazole tetrazolium, Sigma-Aldrich). MTT-converted dyes were solubilized by adding DMSO (Dimethylsulfoxide, Fisher Scientific, St-Laurent, Qc, Canada), and the absorbance measured at a wavelength of 570 nm with background subtraction at 630-690 nm.

Flow Cytometry

Cells were analysed by two-color flow cytometry with FACScan® (Becton-Dickenson) as previously described (22). Thymocytes and splenocytes (10^5 cells/100 μl) were incubated for 30 min. on ice in the presence of one μg of fluorescein-conjugated monoclonal rat anti-mouse anti-CD4 antibody and one μg of rat anti-mouse anti-CD8 antibody conjugated to R-phycoerythrine (eBioscience, San Diego, Ca, USA). Spleen cells were also incubated for 30 min. on ice in the presence of one μg of phycoerythrin-conjugated monoclonal rat anti-mouse anti-CD19 antibody (Cedarlane laboratories, Hornby, Ont., Canada). The cells were washed twice with cold HBSS before FACScan® analysis. Results were analyzed with WinMdi software.

Total Corticosterone Assay

Total CORT was assessed by dextran-coated charcoal radioimunoassay (RIA) as described by Newsome et al. (24) . Briefly, 100 μl of serum sample was heated at 60°C

for 30 minutes to denature CBG and obtain the free-form of CORT. Total CORT concentrations were determined by adding 500 µl of diluted antiserum containing 0.3 pg of anti-CORT (Sigma-Aldrich) to either the heated serum sample or standard CORT (0-1000 pg/100µl:Sigma-Aldrich). After 30 minutes at room temperature, ^{3}H-CORT (25 µCi) (Amersham Biosciences, Baie-D'Urfé, Qc, Canada) was added to each tube and then incubated for 1 hour at 37°C. Samples were cooled to 4°C and 200 µl of dextran-coated charcoal suspension added for 10 minutes at 4°C. After centrifugation, the amount of radioactivity present in the supernatant (bound radioactivity) was determined with a beta-scintillation counter (LKB Wallac).

Free Corticosterone Assay

Plasma free CORT was measured using the procedure previously described by Fleshner et al. (25). Briefly, 100 µl of plasma samples were loaded into 10K MW Millipore filter tubes (Fisher Scientific) and labelled with 10 µl diluted ^{3}H-CORT tracer (25 µCi/ml) (Amersham Biosciences). Tubes were then vortexed, incubated 1 hour at 37°C and spun at 3500 rpm for 20 min at room temperature. Ten µl of filtrate and 10 µl of retentate were removed from each sample and placed into scintillation counting tubes. Radioactivity was counted for 1 min. Free CORT was determined using the following equation: free CORT = (CPM filtrate (Free CORT))/ (CPM retentate (bound CORT)) X total CORT (prior RIA).

CBG Binding Capacity Assay

The measurement of CBG binding capacity was adapted from the method previously described by Hammond and Lahteenmaki (26). Briefly, a saturation binding experiment was conducted with each mouse plasma sample: 20 µl of plasma was incubated with 2 ml of Dextran-Coated Charcoal (DCC) suspension (0.5% Norit A, 0.05% dextran T-70, 0.9% NaCl in PBS 0.01M (phosphate buffer saline) pH7.4) for 60 min. at 37° with intermittent shaking to remove endogenous steroids. DCC was removed by centrifugation (3000 g for 15 min. at room temperature) and the supernatant was further diluted 1:5 in PBS, 0.01M (plasma dilution: 1:500). ^{3}H-CORT stock solution was freshly prepared to a concentration of 1.6 pmol/100µl in PBS buffer. Stock solution was further diluted in PBS to obtain standard solutions of the following concentrations: 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0,0125 pmol/100µl PBS. Duplicate tubes were prepared for total binding, each containing 100µl diluted plasma, 100µl PBS and 100µl of ^{3}H-CORT standards (0.0125-1.6pmol/100µl PBS). A set of tubes for non-specific binding was prepared; these contained 100µl diluted plasma, 100 µl cold CORT (85.8pmol/100µl PBS) and 100µl of ^{3}H-CORT standards (0.0125-1.6pmol/100µl PBS). After thorough mixing, all tubes were incubated 1 hour at room temperature and then placed on ice for 15 min. Cold DCC suspension was added (750µl), the tubes were vortexed and incubated for an additional 10 min. on ice. DCC was removed by centrifugation at 3000 x g for 5 min. at 4°C. The supernatant was decanted from each tube and placed in a scintillation vial to which 3 ml of Scinti-Safe (Fisher Scientific) scintillation fluid was added. The tubes were capped, mixed and the radioactivity counted for 1 min in a LKB Wallac counter with a counting efficiency of 65%.

The concentration of specifically bound CORT was calculated by subtracting the non-specific binding from the mean values of total CORT binding. We then obtained a saturation curve for each sample where the Bmax (saturation point) equals the CBG binding capacity. All saturation binding curves and Scatchard analyses were performed on PRISM 3.0 software (Graphpad, San Diego, Ca, USA). CBG binding capacity is expressed in pM of ^{3}H-CORT bound.

CBG gene expression

CBG gene expression in liver was assayed by Northern blot analysis. The RNA extraction was performed by guanadium thiocyanate-phenol/chloroform method and quantified to normalize the amount of RNA loaded on the gel. Samples were run on a 2.5% agarose gel and transferred onto a nylon Hybond N+ membrane (Amersham Biosciences). The CBG cDNA probe was graciously provided by Dr. Hammond (University of Western Ontario, London, Ont. Canada) and used as described in Scrocchi et al. (27). Redi-Prime beads (Amersham Biosciences) were used to incorporate α-^{32}P dCTP (Amersham Biosciences) into CBG probe. Membranes were stripped and 18S hybridization was performed as a loading control. The CBG signal for each sample was then divided by its corresponding 18S signal. CBG and 18S-probed membranes were analyzed and quantified with a PhosphorImager apparatus (Molecular Dynamics, Amersham Biosciences).

Western blot analysis of CBG in mouse serum

Western blot analysis of CBG in mouse serum was assessed using previously described techniques (27) . Serum samples were diluted 1:100 in phosphate buffer saline (PBS 1X) and the protein concentrations of diluted samples were measured by the Bradford assay (Bio-Rad reagents), using BSA as a standard. 50 μg of protein were diluted in sample buffer and were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electroblotted onto nitrocellulose membranes (VWR, Montréal, Qc, Canada). The membranes were washed in Tris Buffer Saline (TBS: 50 mM Tris , pH 8.0 and 150 mM NaCl) and blocked overnight at 4°C in TBS plus 5% non-fat dry milk (Fisher Scientific). The membranes were then incubated for 4 hours at room temperature with rabbit anti-mouse CBG antiserum (gift from Dr. Hammond, University of Western Ontario, London, Ont. Canada) in TBS plus 5% non-fat dry milk. 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 (Amersham Biosciences).

Statistical analysis

All data are expressed as mean +/- standard error of the mean. Data were analyzed by a one-way ANOVA comparison test using the Statistica 6.0 software program (Statsoft Inc. Tulsa, OK, USA). Differences between groups were considered statistically significant when the probability by chance was less than 5% ($P < 0.05$). CBG-binding capacity analyses were performed on Graphpad Prism 3.0 software. All experiments were performed in duplicate to confirm the results.

Results

Acute exposure to opioid drugs affects the HPA-axis activity, modulating the CORT level (12,15). Figure 1A shows total CORT levels in serum at selected time intervals after implantation of a micro-osmotic pump that delivered either saline or buprenorphine. Total CORT levels were determined in untreated C57BL/6 male mice and were found to range between 50 and 100 ng/ml plasma (data not shown). At day one, total CORT levels in the buprenorphine group were significantly lower than in the saline group (P <0.05). The concentration of CORT increased until day 5 in buprenorphine groups. CORT levels measured after five days of exposure to buprenorphine were higher (35%) as compared to controls, which remained at the same levels as day 1. Differences between the groups were significant at day 5 ($P < 0.05$). At day 10, the CORT levels decreased gradually in both groups and no differences were noted. Overall, the implantation of osmotic pumps caused an increase of total CORT levels, with maximal levels at day 5 and progressively decreasing levels to day 10.

We then wanted to examine whether or not if free and total CORT levels followed the same pattern of variation. Figure 1B shows that the % of free CORT levels were similar between groups while the amount of free CORT (figure 1C) was significantly different one day after the implantation of the pumps ($P < 0.01$).

We also determined the binding capacity of CBG in plasma from each group. Results showed that the CBG binding capacity remained relatively unchanged during the 10 day

experimental period (figure 2A), and that buprenorphine had no effect on CBG binding capacity. To determine if the absence of modulation was due to an increase in CBG concentration, we determined its relative concentration by Western blotting (figure 2B). Results showed no marked difference between saline and buprenorphine groups. Figure 2C shows that buprenorphine did not change the expression of the CBG gene at the mRNA level in the liver when compared to saline controls. Thus, CBG binding capacity, CBG levels in plasma and gene expression of CBG were not affected either by surgical intervention or by buprenorphine administration, and the significant change observed in the amount of free CORT at day 1 of exposition to buprenorphine is related only to a variation in total CORT values.

Immunological studies revealed that chronic exposure to buprenorphine did not affect the total number of thymocytes (figure 3). The number of double-negative thymocytes (DN $CD4^{-}CD8^{-}$) in both control and experimental groups ranged between 3 - 10 x 10^6 cells by thymus throughout the 10-day monitoring period. Saline controls had a significantly higher number of DN cells on the last day of sampling ($P < 0.01$). Double-positive cells (DP $CD4^{+}$ $CD8^{+}$), which include corticosteroid-sensitive cells, were measured and ranged between 60-100 x 10^6 thymocytes per thymus during the 10-day monitoring period. No significant changes were noted between control and experimental groups for this particular thymic sub-population. Single-positive cells expressing CD4 or CD8 ranged between 5 x 10^6 and 14 x 10^6 for CD4+ T cells, and from 2.5 x 10^6 to 7 x 10^6 for CD8+ T cells, throughout the 10-day experiment. No significant differences between groups were observed.

Splenic CD4+ and CD8+ cells were not affected by buprenorphine or surgery during the 10-day experiment (figure 4). The cell values ranged between 18 x 10^6 and 30 x 10^6 for splenic CD4+ T cells and from 10 to 20 x 10^6 for splenic CD8+ T cells and the variations observed in the buprenorphine group corresponded with the changes observed in the saline group. Spleen B cells values ranged between 40 x 10^6 and 60 x 10^6 cells and the variations observed were the same in both groups. Phenotypic analyses of mature splenocytes revealed that chronic exposure to buprenorphine had no major effects.

Chronic exposure to buprenorphine caused a single change in spleen lymphocyte proliferation on day 5 of exposure (figure 5A). In fact, lymphocyte proliferation was comparable between saline and buprenorphine groups on day 1 of exposure. However, after 5 days, a significant increase (75%) in the proliferation of spleen lymphocytes from buprenorphine treated-mice was observed. At day 10 of exposure we noted no change in lymphocyte proliferation. Thus, in contrast to other opioid drugs, buprenorphine had no negative effects on the mitogenic response of T cells.

Discussion

The chronic administration of buprenorphine for ten days had a single effect on free-CORT levels without any change in either the binding capacity or expression of its transporter, CBG. Analysis of the number of cells and of the resident sub-populations of both thymus and spleen also showed no major changes. A transient increase of splenocyte proliferation in response to anti-TCR mAb was noted after 5 days. Overall these results showed that buprenorphine has no deleterious effect on the HPA-axis or on the aspects of the immune system under study.

Implantation of the osmotic pump alone induced a moderate increase of total CORT, which reached 100-125 ng/ml. These values represent a two-fold increase above normal in male C57BL/6 mice (50-75 ng/ml) (29). HPA-axis activation is therefore directly related to the stress induced by osmotic pump implantation. The difference between saline and buprenorphine groups was found to be significant at day 1; thus, total CORT was higher in the saline group. These findings are similar to those described in a previous study, in which mini-osmotic pumps were used for the delivery of immunomodulatory drugs, and resulted in a moderate and short-term increase in CORT levels (30). As the mice adapted to the pump, the high CORT concentrations, reached after 24 hours, gradually decreased to normal values by day 10 in the saline group. Mice implanted with buprenorphine-filled pumps responded less to the preliminary shock induced by the surgical implantation. A previous study has reported that a single injection of buprenorphine to male rats caused a decrease in the endocrine stress response for both

plasma ACTH and CORT concentrations measured in a 3-hour period following the injection. (1). A similar decrease in cortisol values was observed in another study, in which 6 male patients received a single injection of buprenorphine (31). After the initial surgical stress, we noted an increase in total CORT levels at day 5 in the buprenorphine group, as compared to saline-exposed mice. Although total CORT levels measured for the buprenorphine group increased significantly from days 1 to 5, the amount of total CORT was comparable to those obtained in mice which received a saline pump, demonstrating that buprenorphine had no major effect on activating the HPA-axis.

Buprenorphine had no effect on CBG protein levels or CBG binding capacity. Several studies have reported a relationship between GC and variations in CBG levels. High CORT levels have been correlated with decreased CBG binding capacity following an acute stress (32,25). On the other hand, diurnal variations in total and free CORT are not related to CBG variations (33,34). Our study demonstrates that CBG variations were not related to changes in total CORT levels.

The regulation of free CORT levels is directly associated with the production of GC and their binding in plasma by CBG (35). In our study we observed stable % free CORT levels throughout the whole exposure period for both the saline and buprenorphine groups. This means that CBG binding capacity did not differ from one group to another and remained stable during the 10-day exposure period. Thus, variations in total CORT were responsible for changes in the amount of free CORT (biologically active in plasma). A similar experiment (16) showed that rats exposed to morphine pellets exhibited no

change in CORT levels. However, there were marked time- and dose-dependent increases in the concentration of CBG. Moreover, Naltrexone, a multiple opioid receptor antagonist, blocked the morphine-induced increase of CBG. High CBG levels in plasma after chronic exposure to morphine are responsible for sequestering more CORT, which may dampen the response to stress. Our findings show that buprenorphine had no effect on regulating CBG production or binding capacity, so that the amount of free CORT reflected only changes in the synthesis of the hormone. The amount of free CORT measured during the 10-day monitoring period followed the variations of total CORT levels, and the significant difference observed at day 1 for total CORT was reflected in free CORT levels.

In contrast to other opioid drugs, buprenorphine did not cause any changes in thymus or spleen lymphocyte populations. However, buprenorphine increased splenic lymphocyte proliferation upon anti-TCR mAb stimulation after five days of treatment. These results have been observed with female C3H mice (21). Immunotoxicological studies on buprenorphine showed no negative effects of this drug as compared to morphine (1,19).

In comparison to other opioid drugs, buprenorphine appears to have fewer effects on the immune system. Bryant et al. (36) observed a marked atrophy of the thymus and spleen, accompanied by a reduced splenocyte proliferative response to Con-A in morphine-treated mice. In rats treated with morphine delivered chronically via a minipump, immunosuppressive effects (NK cell activity, T-cell proliferation and IFN-γ production) were also reported (37, 38). It was suggested that morphine induced immunosuppression

by increasing adrenal axis activity (12). Even though we observed a positive effect of the drug on splenocyte proliferation at day 5, this situation was temporary, since values similar to saline-treated mice were measured in the buprenorphine group after day 10 of exposure. Since no changes in CORT levels or in CBG levels were noted, it does not appear to be related to an HPA-axis modulation.

Over the past few years, it has become clear that GC play a role in the development and maintenance of normal immunity (39). A long-term increase in GC levels is known to be immunosuppressive; therefore, it seemed necessary to evaluate the impact of chronic administration of buprenorphine on CORT production, availability in plasma, and also on immune functions. In this study, we noted that chronic exposure to buprenorphine by C57BL/6 male mice, via a mini-osmotic pump, did not change CORT availability in plasma and did not modulate the immune response. Buprenorphine can reduce pain without the side effects caused by morphine. Thus, our results clearly indicate that buprenorphine may be a good candidate for critically traumatized patients requiring pain relief.

References

[1] Gomez-Flores, R, Weber, RJ. Differential effects of buprenorphine and morphine on immune and neuroendocrine functions following acute administration in the rat mesencephalon periaqueductalgray. Immunopharmacology 48 (2000) 145-156.

[2] Kajiwara, M, Aoki, K, Ishii, K, Numata, H, Matsumiya, T, Oka, T. Agonist and antagonist actions of buprenorphine on three types of opioid receptor in isolated preparations. Jpn. J. Pharmacol. 40 (1986) 95-101.

[3] Kamei, J, Sodeyama, M, Tsuda, M, Suzuki, T, Nagase, H. Antinociceptive effect of buprenorphine in mu1-opioid receptor deficient CXBK mice. Life Sci. 60 (1997) 333-337.

[4] Kobayashi, K, Yamamoto, T, Chiba, K, Tani, M, Shimada, N, Ishizaki, T, Kuroiwa, Y. Human buprenorphine N-dealkylation is catalyzed by cytochrome P450 3A4. Drug Metab. Dispos. 26 (1998) 818-821.

[5] Weber, RJ, Band, LC, deCosta, B, Pert, A, Rice, KC. Neural control of immune function: opioids, opioid receptors and immunosuppression. NIDA Res. Monogr. 105 (1991) 96-102.

[6] Roy, S, Loh, HH. Effects of opioids on the immune system. Neurochem. Res. 21 (1996) 1375-1386.

[7] Carr, DJ, Carpenter, GW, Garza, HH Jr, Baker, ML, Gebhardt, BM. Cellular mechanisms involved in morphine-mediated suppression of CTL activity. Adv. Exp. Med. Biol. 373 (1995) 131-139.

[8] Madden, JJ, Whaley, WL, Ketelsen, D. Opiate binding sites in the cellular immune system: expression and regulation. J. Neuroimmunol. 83 (1998) 57-62.

[9] Fuchs, BA, Pruett, SB. Morphine induces apoptosis in murine thymocytes in vivo but not in vitro: involvement of both opiate and glucocorticoid receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther. 266 (1993) 417-423.

[10] Sei, Y, Yoshimoto, K, McIntyre, T, Skolnick, P. Arora, PK. 1991 Morphine-induced thymic hypoplasia is glucocorticoid-dependent. J. Immunol. 146 (1991) 194-198.

[11] Hall DM, Suo, JL, Weber, RJ. Opioid mediated effects on the immune system: sympathetic nervous system involvement. J. Neuroimmunol. 83 (1998) 29-35.

[12] Freier, DO, Fuchs, BA. A mechanism of action for morphine-induced immunosuppression: corticosterone mediates morphine-induced suppression of natural killer cell activity. J. Pharmacol. Exp. Ther. 270 (1994) 1127-1133.

[13] Mellon, RD, Bayer, BM. Evidence for central opioid receptors in the immunomodulatory effects of morphine: review of potential mechanism(s) of action. J. Neuroimmunol. 83 (1998) 19-28.

[14] Lesage, J, Bernet, F, Montel, V, Dupouy, JP. Morphine-induced stimulation of pituitary-adrenocortical activity is mediated by activation of nitric oxide in the early stages of postnatal life in the rat. Eur. J. Endocrinol. 144 (2001) 441-451.

[15] Nock, B, Cicero, TJ, Wich, M. Chronic exposure to morphine decreases physiologically active corticosterone in both male and female rats but by different mechanisms. J. Pharmacol. Exp. Ther ..286 (1998) 875-882.

[16] Nock, B, Wich, M, Cicero, TJ. Chronic exposure to morphine increases corticosteroid-binding globulin. J. Pharmacol. Exp. Ther. 282 (1997) 1262-1268.

[17] Hammond, GL, Smith, CL, Underhill, DA. Molecular studies of corticosteroid binding globulin structure, biosynthesis and function. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 40 (1991) 755-762.

[18] Garrel, DR. Corticosteroid-binding globulin during inflammation and burn injury: nutritional modulation and clinical implications. Horm. Res. 45 (1996) 245-251.

[19] Van Loveren, H, Gianotten, N, Hendriksen, CF, Schuurman, HJ, Van der Laan, JW. Assessment of immunotoxicity of buprenorphine. Lab. Anim. 28 (1994) 355-363.

[20] Rolandi, E, Marabini, A, Franceschini, R, Messina, V, Bongera, P, Barreca, T. Changes in pituitary secretion induced by an agonist-antagonist opioid drug, buprenorphine. Acta Endocrinol. 104 (1983) 257-260.

[21] Jobin, N, Garrel, DR, Bernier, J. Increased burn-induced immunosuppression in lipopolysaccharide-resistant mice. Cell. Immunol. 200 (2000a) 65-75.

[22] Jobin, N, Garrel, DR, Champoux J, Bernier, J. Improved immune functions with administration of a low-fat diet in a burn animal model. Cell. Immunol 206 (2000b) 71-84.

[23] Fatherazi, S, Lai, H, Kazi, S, Horita, A. Intraseptal morphine potentiates pentobarbital narcosis and hypothermia in the rat. Pharmacol. Biochem. Behav. 23 (1985) 505-507.

[24] Newsome, HH Jr, Clements, AS, Borum, EH. 1972 The simultaneous assay of cortisol, corticosterone, 11-deoxycortisol, and cortisone in human plasma. J. Clin. Endocrinol. Metab. 34 (1972) 473-483.

[25] Fleshner, M, Deak, T, Spencer, RL, Laudenslager, ML, Watkins, LR, Maier, SF. A long-term increase in basal levels of corticosterone and a decrease in corticosteroid-binding globulin after acute stressor exposure. Endocrinology 136 (1995) 5336-5342.

[26] Hammond, GL, Lahteenmaki, PL. A versatile method for the determination of serum cortisol binding globulin and sex hormone binding globulin binding capacities. Clin. Chim. acta 31 (1983) 101-110.

[27] Scrocchi, LA, Orava, M, Smith, CL, Han, VK, Hammond, GL. Spatial and temporal distribution of corticosteroid-binding globulin and its messenger ribonucleic acid in embryonic and fetal mice. Endocrinology 132 (1993) 903-909.

[28] Ashwell, JD, Lu, FW, Vacchio, MS. Glucocorticoids in T cell development and function. Annu. Rev. Immunol. 18 (2000) 309-345.

[29] Bethin, KE, Vogt, SK, Muglia, LJ. Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 97(2000) 9317-22.

[30] Rowland, RR, Reyes, E, Chukwuocha, R, Tokuda, S. Corticosteroid and immune responses of mice following mini-osmotic pump implantation. Immunopharmacology 20 (1990) 187-190.

[31] Pende, A, Musso, NR, Montaldi, ML, Pastorino, G, Arzese, M, Devilla, L. Evaluation of the effects induced by four opiate drugs, with different affinities to opioid receptor subtypes, on anterior pituitary LH, TSH, PRL and GH secretion and on cortisol secretion in normal men. Biomed. Pharmacother. 40 (1986) 178-182.

[32] Tannenbaum, B, Rowe, W, Sharma, S, Diorio, J, Steverman, A, Walker, M, Meaney, MJ. Dynamic variations in plasma corticosteroid-binding globulin and basal HPA activity following acute stress in adult rats. J. Neuroendocrinol. 9 (1997) 163-168.

[33] Hsu, BR, Kuhn, RW. The role of the adrenal in generating the diurnal variation in circulating levels of corticosteroid-binding globulin in the rat. Endocrinology 122 (1988) 421-426.

[34] D'Agostino, J, Vaeth, GF, Henning, SJ. Diurnal rhythm of total and free concentrations of serum corticosterone in the rat. Acta Endocrinol. 100 (1982) 85-90.

[35] Bryant, HU, Bernton, EW, Holaday, JW. Morphine pellet-induced immunomodulation in mice: temporal relationships. J. Pharmacol. Exp. Ther. 245 (1998) 913-920.

[36] Rosner, W. Plasma steroid-binding proteins. Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 20 (1991) 697-720.

[37] West, JP, Dykstra, LA, Lysle, DT. Differential tolerance to morphine's immunomodulatory effects following continuous administration. Drug Alcohol Depend. 53 (1998) 31-38.

[38] Tsai, YC, Won, SJ, Lin, MT. Effects of morphine on immune response in rats with sciatic constriction injury. Pain 88 (2000) 155-160.

[39] Jefferies, WM. Cortisol and immunity. Med. Hypotheses 34 (1991) 198-208.

Acknowledgements

The present study was supported by a grant from Fonds de la Recherche en Santé du Québec and by the Fondation des Pompiers du Québec pour les Grands-Brûlés.

Michele D'Elia was supported by a research award from the Fondation Armand-Frappier.

Legend of figures

Figure. 1. Buprenorphine caused an increase of total CORT without significant changes in free CORT. Serum total CORT (A), free CORT % (B) and free CORT concentration (C) levels at selected time intervals after implantation of either saline (•) or buprenorphine (■) filled osmotic pump. On day 1, buprenorphine significantly decreased total serum CORT ($P < 0.05$) while on day 5, buprenorphine significantly increased total serum CORT concentration ($P < 0.05$) (A). Buprenorphine did not prevent the decline of serum CORT that also occurred in the saline group. (n = 5 mice/group). Levels of % Free CORT remained stable (B) while the amount of free CORT decreased significantly ($P < 0.05$) after day 5 in the saline group only.

Figure. 2. Chronic exposure to buprenorphine had no effect on CBG synthesis and function. A [3H]CORT binding assay to CBG was performed from plasma collected in heparinized coated tubes by cardiac puncture on male mice implanted with either saline (•) or buprenorphine (■) filled pump, (n = 5 mice/group). Buprenorphine had no significant effect on CBG binding capacity (A), CBG protein levels (B) and CBG mRNA expression in liver (C). Western blot results reveal a unique band at 66 kDa corresponding to CBG; one over three conducted experiments is shown. Northern blot results are expressed as the mean relative intensity of CBG mRNA signal for buprenorphine group (black) compared to saline-control group (grey), which represents 100%.

Figure. 3. Buprenorphine did not cause any major changes in thymocyte sub-population. Phenotyping of thymocyte sub-populations of chronically-exposed mice to saline or buprenorphine was performed after 1, 5 and 10 days. The values are expressed as a ratio of total number of cells from buprenorphine and saline groups, and represent the mean result for each group at specific time intervals, (n = 5 mice/group). No changes were noted in single-positive cells (CD4+CD8- (C), CD4-CD8+ (D)) or in double-positive cells (CD4+CD8+ (B)). A significant decrease in double-negative cells (CD4-CD8- (A)) was observed at day 10 ($P < 0.01$) in buprenorphine-treated mice.

Figure. 4. Spleen cell subpopulations remained unchanged after buprenorphine exposure. Spleen cells from saline and buprenorphine mice were analysed for the number of CD4+ (A) and CD8+ T cells (B) and CD19+ B cells by flow cytometric analysis. The values are expressed as a ratio of total number of cells from buprenorphine and saline groups and represent the mean result for each group at specific time intervals, (n = 5 mice/group). The drug had no effect on either splenic T- or B-cell populations.

Figure. 5. Buprenorphine increases splenocytes proliferative response to anti-TCR mAb. Effect of saline (grey) or buprenorphine (black) on splenic in vitro T-lymphocyte proliferation. 1 μg/ml of anti-TcR mAb was used to induce splenic T-cell proliferation. Data represent the mean +/- SEM of three replicate determinations for each individual (n = 5 mice/group) from a representative experiment. Statistical analyses indicated a significant difference between saline and buprenorphine groups ($P < 0.05$) for splenocyte proliferation induced by anti-TcR stimulation on day 5.

Figure 1. D'Elia M. et al.

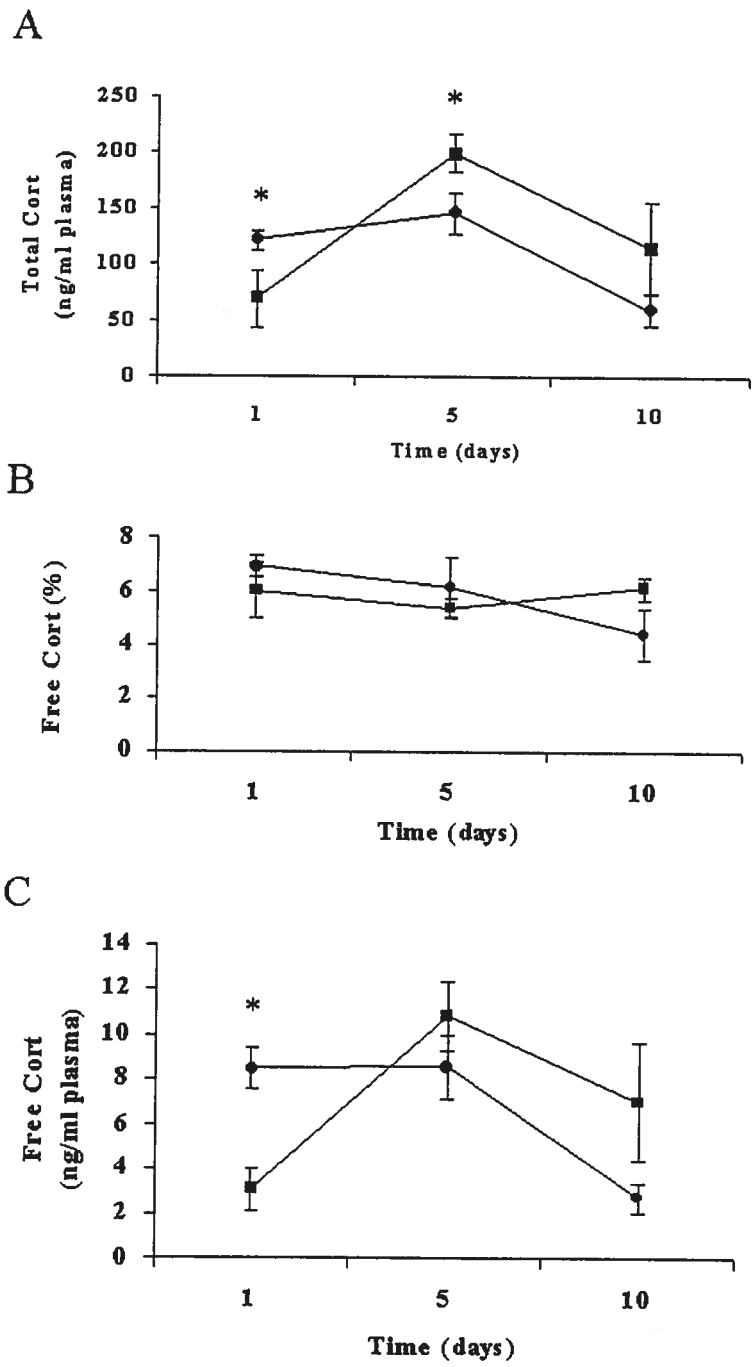
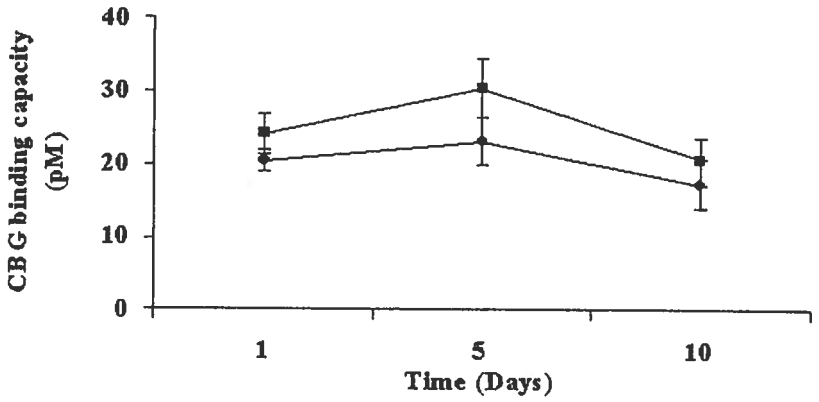
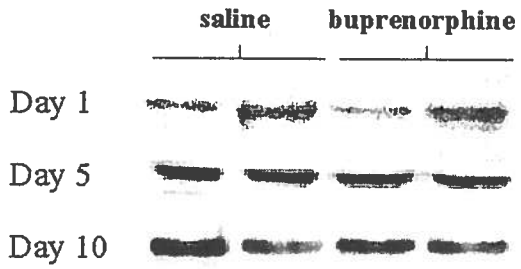


Figure 2. D'Elia M. et al.

A



B



C

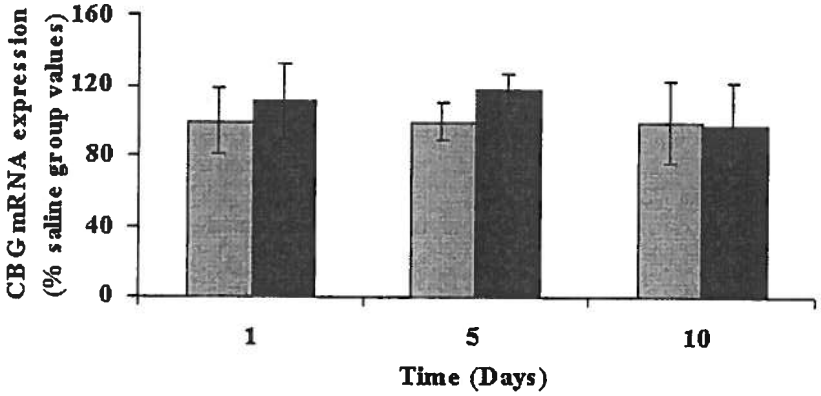


Figure 3. D'Elia M. et al.

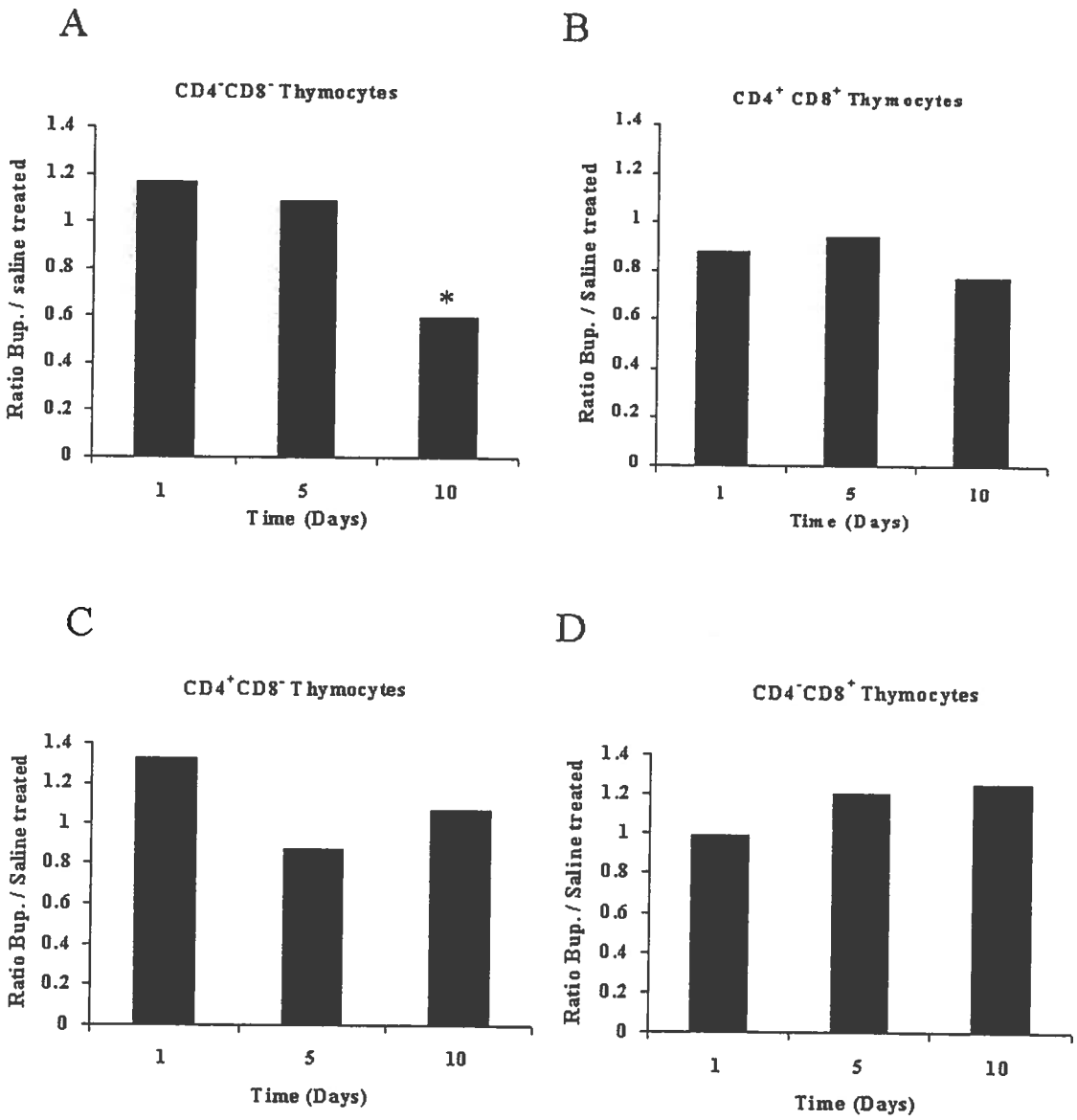


Figure 4. D'Elia M. et al.

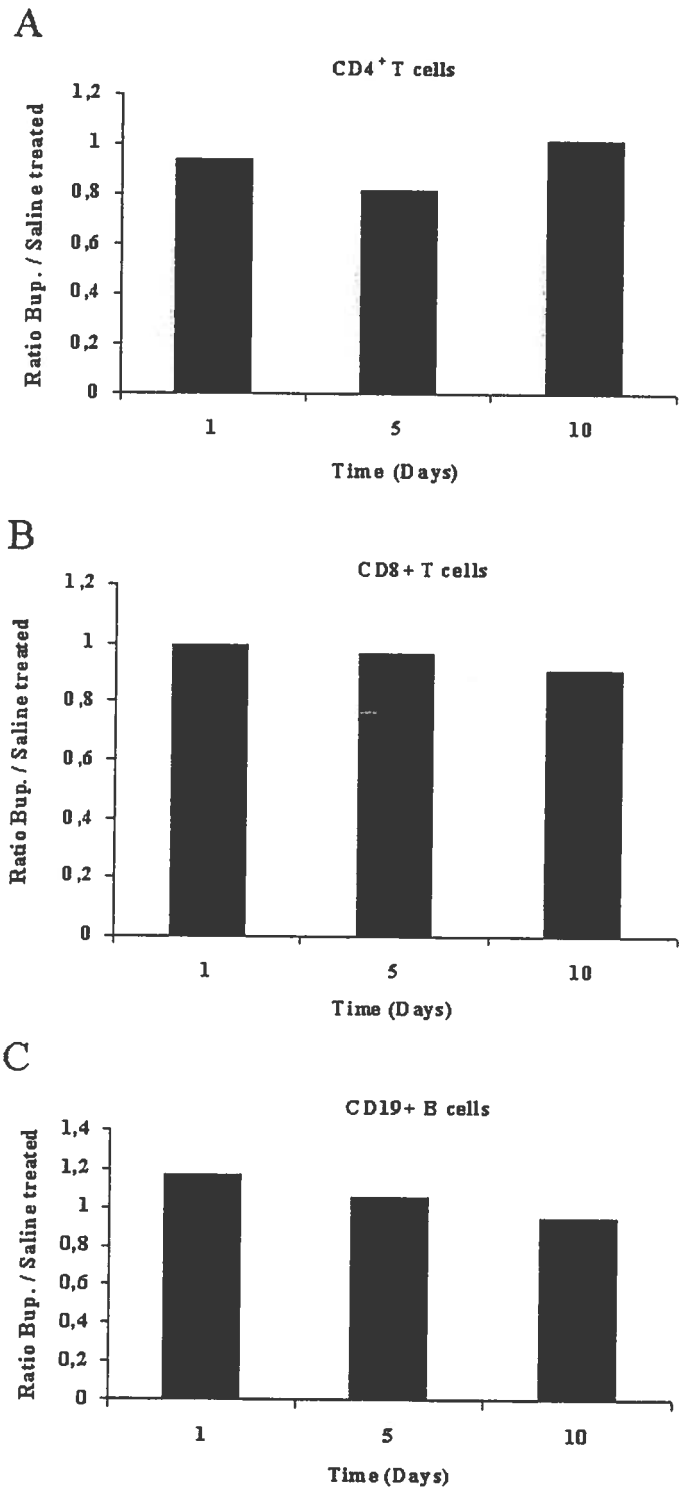
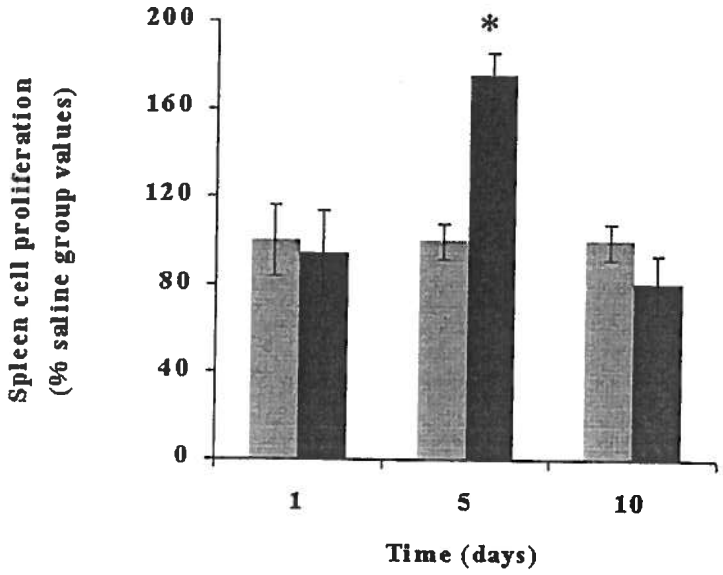


Figure 5. D'Elia M. et al.



2. ARTICLE # 2 : FREE CORTICOSTERONE ASSOCIATED WITH THE DECREASE OF CORTICOSTEROID BINDING GLOBULIN IN MICE AFTER BURN INJURY CORRELATE WITH THYMUS ATROPHY.

2.1 Résumé français de l'article # 1

La fraction libre du corticosterone associée avec une diminution de la CBG (Corticosteroid-binding globulin) est responsable de l'atrophie thymique observée suite à une brûlure sévère chez la souris

Michele D'Elia, Julie Patenaude, Dominique R. Garrel et Jacques Bernier

Les blessures causées par des brûlures sévères induisent un stress énorme à l'organisme. Celà implique une mobilisation complète du système endocrinien. Par ailleurs, peu d'études font objet de l'impact d'un tel stress sur la réponses endocrinienne et immunitaire. L'objectif principal de ce projet fut de mesurer les effets d'une brûlure sévère sur les niveaux d'hormones de stress présentes chez des souris et d'ainsi déterminer dans le temps, les changements qui surviennent au niveau de la concentration en Cort associée avec la diminution des cellules du thymus. Méthode : Les souris furent séparées en deux groupes et ce, pour chaque jour où fut effectuée l'exprérience : 1) buprenorphine-sham, 2) buprenorphine + brûlure totalisant 20 % de la surface du corps. La réponse endocrinienne fut mesurée aux jours 0.5, 1, 2, 5 et 10 en déterminant les niveaux de Cort total et libre, la capacité de liaison de la CBG (B_{max}) ainsi que le niveau d'expression dans le foie de l'ARNm codant pour la CBG. Dans cette étude, nous avons mesuré une augmentation rapide du Cort total au jour 2 suivant le traumatisme de la brûlure. De plus, nous avons remarqué une baisse de la capacité de liaison de la CBG aux jours 1 et 2 post-brûlure. La réunion de ces deux paramètres résulta en une augmentation significative du pourcentage de Cort libre atteignant un maximum 2 jours suivant la brûlure. Nous y avons mesuré des niveaux de Cort libre 5 fois plus élevé chez les souris brûlées. Nos résultats de buvardage Western ont montré une baisse de la concentration en

CBG dans le sérum de souris brûlées au moment même où nous avons observé des niveaux élevés de Cort libre. L'analyse de l'expression du gène de la CBG dans le foie a démontré une baisse de l'expression du gène qui précède la diminution de la CBG dans le sérum. Le retour à des valeurs normales pour tous les paramètres fut observé 5 jours post-brûlure. L'analyse des cellules du thymus par cytométrie en flux a démontré une diminution de la cellularité (perte de 50% de la masse thymique) entre le jour 1 et 2 post-brûlure causée par une diminution de cellules cortico-sensibles. En effet, les analyses de phénotypage ont prouvé qu'il s'agissait des cellules immatures représentées par l'expression concomitante des marqueurs de surface CD4 et CD8 ou par la présence du marqueur CD24. Finalement, nous avons réussi à démontré une corrélation positive entre l'augmentation des niveaux de Cort libre et la diminution des cellules immatures du thymus, $p< 0.01$. Sommes toutes, une réponse endocrienne reliée au stress survient 48 heures suivant la brûlure. Le Cort libre et total, la capacité de liaison de la CBG ainsi que l'expression de son ARNm dans le foie, furent tous des paramètres impliqués dans cette réponse. Le changement observé au niveau du Cort libre et résultant d'une baisse de synthèse ou de la capacité de liaison de la CBG corréla positivement avec la réduction des thymocytes immatures.

2.2 Article # 2

Free corticosterone associated with the decrease of corticosteroid binding globulin in mice after burn injury correlates with thymus atrophy.

Free Cort and decreased CBG cause thymus atrophy after burn injury

Michele D'Elia, Julie Patenaude, Claudine Hamelin, Dominique R. Garrel*, Jacques Bernier.

Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, Department of Human Health, Université du Québec, Montréal (Pointe-Claire), Québec, Canada, H9R 1G6 and CHUM, centre hospitalier de l'Université de Montréal, Grands-Brûlés center (Dr Garrel), Montréal, Québec, Canada H2W 1T8

Address: Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, 245 Hymus Blvd, Pointe-Claire (Montréal), Québec, Canada H9R 1G6

Tel: (514) 630-8846

FAX: (514) 630-8850

e-mail: michele.delia@inrs-iaf.uquebec.ca

Ask reprints to: Dr Jacques Bernier,

Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier,

245 Hymus Blvd, Pointe-Claire (Montréal), Québec, Canada

H9R 1G6

Key words: Corticosterone, Corticosteroid-Binding globulin, Burn injury, Thymus, Atrophy, T cells.

Grants and fellowships: Fonds de la Recherche en Santé du Québec and Fondation des Pompiers du Québec pour les Grands-Brûlés

Abstract

Thermal injury is extremely stressful and data characterising the systemic endocrine stress response to these injuries are sparse. The objective of this study was to measure the effects of thermal injury on stress hormone levels in mice and to assess the temporal changes of corticosterone (Cort) associated with the depletion of thymic cells. Methods: Mice were separated in two groups for each experimental day: 1) buprenorphine-sham, 2) buprenorphine and 20% total body surface area burn. The endocrine stress response was assayed by determining total-, free-Cort, Corticosteroid-Binding Globulin (CBG) binding capacity (B_{max}), circulating CBG and liver CBG mRNA at 0.5, 1, 2, 5 and 10 days post-burn. Results: Following thermal injury, a rapid increase of total Cort was observed in the first 48 hours. This was associated with a decrease of CBG B_{max} occurring at day 1 and 2 post-burn. Free Cort percentage in the burn group peaked at day 2 post-burn. This resulted in a dramatic increase (5-fold) of free Cort levels. While low CBG concentrations in burned-mice serum were observed by Western blot. Analyses of hepatic CBG mRNA expression showed a rapid decrease observed within the first 24 hours post-burn. Five days after thermal injury, total-, free-Cort, CBG protein and mRNA levels returned to control values. Flow cytometric analysis of thymic cells, which include cortico-sensible cells, showed a dramatic decrease of cellularity (50% less), 24 and 48 hours after burn injury. Phenotypic analyses showed that the immature cells, exemplified by the concomitant expression of CD4 and CD8 or by the CD24 surface protein, are significantly altered. A positive correlation was determined between the free Cort concentration and the depletion of immature thymic cells ($p< 0.01$). Conclusions: An endocrine stress response occurs within the first 48 hours after burn injury. Total-, free-

Cort, CBG binding and its hepatic mRNA expression where all affected. The change in free Cort resulting in the loss of CBG binding capacity or synthesis positively correlated with the decrease of immature thymocytes. Overall, our results demonstrate the importance of CBG in regulating Cort's action on cortico-sensible immune cells.

Introduction

It is a fact that severe injuries including a burn injury, can suppress the immune system, predispose injured patients to infection and increase morbidity and mortality (1-3). Immune suppression is caused mainly by alterations in T cells subpopulations from blood and lymphoid organs (4,5). Increased apoptosis of T lymphocytes in the thymus early after burn injury has been reported and may be caused by stress mediators such as FasLigand (CD95L, FasL, Apo1L) interactions, heat shock proteins (HSPs), tumor-necrosis factor-α (TNF-α) as well as by glucocorticoids (GC) (6-10). Increased circulating levels of GC measured after a burn injury are caused by the activation of HPA-axis (11). Depending on the nature of the stimulus, HPA-axis can be triggered by various factors such as TNF-α, (interleukin) IL-1 and IL-6 released mainly from immune cells (12-13). The thymic response to high GC levels is a reversible loss of thymus mass (14). In fact, GC have been known to induce T lymphocyte cell death (apoptosis) at physiological levels where endogenously produced corticosterone (Cort) caused T-cell apoptosis (15). GC action is mediated by its interaction with GC receptors (GR) present in the cytoplasm of T-cells. GC also have an impact on T-cell proliferation and maturation in the thymus (16,17). Recently, it was demonstrated that thymic epithelial cells can produce GC thus supporting to the hypothesis that GC are important in regulating T-cell differentiation (18-21). Moreover, it was shown that the balance between GR and TCR delivered signals in the thymus were important in the generation of a mature and effective T-cell population (22). While double-positive immature $CD4^{+}CD8^{+}$ thymocytes are highly sensitive to GC-induced apoptosis, mature T-cells that bare a TCR^{high} surface receptor are resistant to GC action (23).

GC action is regulated by their binding to plasma carrier proteins which sequestrate the hormone and inhibit its activity on cells. Corticosteroid-binding globulin (CBG) is the specific transport protein for serum Cort. CBG carries more than 80 % of total Cort while 10% is generally bound to albumin. The free fraction of Cort, which represents approximately 5% of total Cort, is the biologically active fraction that is available for tissues (24). CBG is primarily produced in the liver and changes in circulating CBG levels occur after stress because GC play an inhibitory role in the control of hepatic CBG synthesis (25-26). Moreover, it was demonstrated that IL-6, a cytokine that plays an important role in hepatic acute phase response, can inhibit CBG synthesis in human hepatostoma-derived cells probably by decreasing CBG mRNA stability (27). Also, high IL-6 levels in burn patients correlated with decreased serum CBG concentration (28). Initially, it was demonstrated that hormone binding globulins like TBG and CBG, underwent serpin conformational change during inflammation thus reducing their binding capacity (29). It was then shown that CBG was sensitive to protease activity, specifically neutrophil elastase, which reduces considerably CBG binding capacity (30) . Knowing that proteases are released in elevated levels during inflammation, CBG stability could be compromised after a burn injury. Moreover, a change in CBG synthesis or binding capacity for Cort during inflammation may be important in regulating Cort-driven activities in numerous tissues and organs after a burn injury.

The purpose of this study was to assess, for the first time, both endocrine and immune system modulations following a severe burn injury and to evaluate several parameters at

different time-intervals post-burn injury. In the present study, we first established at different time-intervals after a burn injury total-,free- Cort and free Cort percentage. Secondly, we established the effect of burn injury on CBG concentration, binding capacity in the serum and on its hepatic mRNA expression for the same time-interval points. Then, we correlated endocrine effects to changes in thymus homeostasis. To do so, phenotypic analysis of thymic sub-populations were carried out. With this technique, we have been able to demonstrate the influence of CBG in regulating Cort availability and consequently, its effect on cortico-sensitive T-cells.

Materials and Methods

Animals

All experiments were performed on 6 week-old male mice : C57BL/6 (Charles River Laboratories, St-Constant, Qc, 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 5 mice. Standard chow (Richmond standard lab diet, Lab Diet, Richmond, IN) 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.

Alzet Microosmotic Pump

Micro-osmotic pumps were installed as described previously (21). On day 0 of the experiment, mice were anaesthetized with Isoflurane gas (CDMV, St-Hyacinthe, Qc, Canada) and the upper sternal region of each mouse was shaved. Animals were randomly assigned to a control saline group or buprenorphine group, each group containing five animals per day of experiment. Alzet micro-osmotic pumps (Durcet Corp. Cuprentino, Ca. USA) were inserted subcutaneously by an incision made on the upper sternal skin and pushed carefully down to the peritoneal cavity. Surgical sutures were used to close the wound. All animals survived the procedures. Control group mice received a 0.9% saline-filled pump and buprenorphine-treated mice received a pump delivering 0.1 ml/kg of buprenorphine (Reckitt and Coleman Pharmaceuticals, Richmond, Va) per 12 h. For a 20g mouse, this is equivalent to 2.0 μg/12h of buprenorphine (0.2mg/kg body

weight/day). This dose of buprenorphine is optimal for relief of pain (21,22). The delivery of buprenorphine by the pumps was determined indirectly 12h later by the ability of mu receptor agonist drugs to potentiate pentobarbital-induced hypothermia (23).

Sacrifice and Organ Preparation

On days 1, 5 and 10 after treatment, the animals were anaesthetized with Isoflurane and killed by cardiac puncture. Peripheral blood was collected in a heparinized coated tube and kept on ice. Plasma was collected after centrifugation and kept at –20 °C. Livers were frozen immediately in liquid nitrogen and kept at –80 °C until assays were performed. Thymuses were removed and prepared immediately for study.

Preparation of Thymus Cell Suspensions

Thymuses were prepared individually as single-cell suspensions by teasing apart the matrix in Hank's balanced salt solution (HBSS, Sigma-Aldrich, Oakville, Ont. Canada). The suspensions were washed three times in HBSS and the spleen cells depleted of red blood cells by osmotic shock in Gey's solution supplemented with NH_4Cl, 0.155 M. The cells were resuspended in RPMI 1640 medium (Biomedia, Drummundville, Qc, Canada) supplemented with 50 μM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Oakville, Ont. Canada), 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Biomedia), and antibiotic solution (100 IU/ml penicillin and 100 μg/mL streptomycin (Biosource, Montreal, Qc, Canada). Cell viability was determined by trypan blue exclusion and was consistently greater than 90%.

Flow Cytometry

Cells were analysed by three-color flow cytometry with FACScan® (Becton-Dickenson) as previously described (32). Thymocytes (10^5 cells/100 µl) were incubated for 30 min. on ice in the presence of 1 µg of fluorescein-conjugated monoclonal rat anti-mouse anti-CD4, 1 µg of rat anti-mouse anti-CD8 conjugated to R-phycoerythrine (ebioscience, San Diego, Ca, USA) and 1 µg biotin anti-TcR mAb H-57-597 (H-57) or 1 µg rat anti-mouse biotin anti-CD24 (Cedarlane laboratories Ltd, Hornby, Ont. Canada) or one µg rat anti-mouse biotin anti-Qa.2 (B-D Biosciences, Mississauga, Ont. Canada) all conjugated to streptavidin-Pe/Cy5 molecule (Cedarlane). Cells were washed twice with cold HBSS and analysed in FACScan. Results were analysed with the WinMdi 2.8 software (Scripps Research Institute, La Jolla, CA USA).

Total Corticosterone Assay

Total CORT was assessed by dextran-coated charcoal radioimunoassay (RIA) as described by Newsome et al. (24) . Briefly, 100 µl of serum sample was heated at 60°C for 30 minutes to denature CBG and obtain the free-form of CORT. Total CORT concentrations were determined by adding 500 µl of diluted antiserum containing 0.3 pg of anti-CORT (Sigma-Aldrich) to either the heated serum sample or standard CORT (0-1000 pg/100µl:Sigma-Aldrich). After 30 minutes at room temperature, ^{3}H-CORT (25 µCi) (Amersham Biosciences, Baie-D'Urfé, Qc, Canada) was added to each tube and then incubated for 1 hour at 37°C. Samples were cooled to 4°C and 200 µl of dextran-coated charcoal suspension added for 10 minutes at 4°C. After centrifugation, the amount of

radioactivity present in the supernatant (bound radioactivity) was determined with a beta-scintillation counter (LKB Wallac).

Free Corticosterone Assay

Plasma free CORT was measured using the procedure previously described by Fleshner et al. (25). Briefly, 100 µl of plasma samples were loaded into 10K MW Millipore filter tubes (Fisher Scientific) and labelled with 10 µl diluted ^{3}H-CORT tracer (25 µCi/ml) (Amersham Biosciences). Tubes were then vortexed, incubated 1 hour at 37°C and spun at 3500 rpm for 20 min at room temperature. Ten µl of filtrate and 10 µl of retentate were removed from each sample and placed into scintillation counting tubes. Radioactivity was counted for 1 min. Free CORT was determined using the following equation: free CORT = (CPM filtrate (Free CORT))/ (CPM retentate (bound CORT)) X total CORT (prior RIA).

CBG Binding Capacity Assay

The measurement of CBG binding capacity was adapted from the method previously described by Hammond and Lahteenmaki (26). Briefly, a saturation binding experiment was conducted with each mouse plasma sample: 20 µl of plasma was incubated with 2 ml of Dextran-Coated Charcoal (DCC) suspension (0.5% Norit A, 0.05% dextran T-70, 0.9% NaCl in PBS 0.01M (phosphate buffer saline) pH7.4) for 60 min. at 37° with intermittent shaking to remove endogenous steroids. DCC was removed by centrifugation (3000 g for 15 min. at room temperature) and the supernatant was further diluted 1:5 in PBS, 0.01M (plasma dilution: 1:500). ^{3}H-CORT stock solution was freshly prepared to a concentration

of 1.6 pmol/100µl in PBS buffer. Stock solution was further diluted in PBS to obtain standard solutions of the following concentrations: 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0,0125 pmol/100µl PBS. Duplicate tubes were prepared for total binding, each containing 100µl diluted plasma, 100µl PBS and 100µl of ^{3}H-CORT standards (0.0125-1.6pmol/100µl PBS). A set of tubes for non-specific binding was prepared; these contained 100µl diluted plasma, 100 µl cold CORT (85.8pmol/100µl PBS) and 100µl of ^{3}H-CORT standards (0.0125-1.6pmol/100µl PBS). After thorough mixing, all tubes were incubated 1 hour at room temperature and then placed on ice for 15 min. Cold DCC suspension was added (750µl), the tubes were vortexed and incubated for an additional 10 min. on ice. DCC was removed by centrifugation at 3000 x g for 5 min. at 4°C. The supernatant was decanted from each tube and placed in a scintillation vial to which 3 ml of Scinti-Safe (Fisher Scientific) scintillation fluid was added. The tubes were capped, mixed and the radioactivity counted for 1 min in a LKB Wallac counter with a counting efficiency of 65%.

The concentration of specifically bound CORT was calculated by subtracting the non-specific binding from the mean values of total CORT binding. We then obtained a saturation curve for each sample where the Bmax (saturation point) equals the CBG binding capacity. All saturation binding curves and Scatchard analyses were performed on PRISM 3.0 software (Graphpad, San Diego, Ca, USA). CBG binding capacity is expressed in pM of ^{3}H-CORT bound.

CBG gene expression

CBG gene expression in liver was assayed by Northern blot analysis. The RNA extraction was performed by guanadium thiocyanate-phenol/chloroform method and quantified to normalize the amount of RNA loaded on the gel. Samples were run on a 2.5% agarose gel and transferred onto a nylon Hybond N+ membrane (Amersham Biosciences). The CBG cDNA probe was graciously provided by Dr. G. Hammond (University of Western Ontario, London, Ont. Canada) and used as described in Scrocchi et al. (27). Redi-Prime beads (Amersham Biosciences) were used to incorporate α-^{32}P dCTP (Amersham Biosciences) into CBG probe. Membranes were stripped and 18S hybridization was performed as a loading control. The CBG signal for each sample was then divided by its corresponding 18S signal. CBG and 18S-probed membranes were analyzed and quantified with a PhosphorImager apparatus (Molecular Dynamics, Amersham Biosciences).

Western blot analysis of CBG in mouse serum

Western blot analysis of CBG in mouse serum was assessed using previously described techniques (27) . Serum samples were diluted 1:100 in phosphate buffer saline (PBS 1X) and the protein concentrations of diluted samples were measured by the Bradford assay (Bio-Rad reagents), using BSA as a standard. A 50 μg aliquot of protein was diluted in sample buffer and subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electroblotted onto a nitrocellulose membrane (VWR, Montréal, Qc, Canada). The membranes were washed in Tris Buffered Saline (TBS: 50 mM Tris , pH 8.0 and 150 mM NaCl) and blocked overnight at 4°C in TBS plus 5% non-fat dry milk (Fisher Scientific).

The membranes were then incubated for 4 hours at room temperature with rabbit anti-mouse CBG antiserum (gift from Dr. G. Hammond, University of Western Ontario, London, Ont. Canada) in TBS plus 5% non-fat dry milk and 0.1 % Tween-20 (Fisher Scientific). 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 (Amersham Biosciences).

Statistical analysis

All data are expressed as mean +/- standard error of the mean. Data were analyzed by a one-way ANOVA comparison test using the Statistica 6.0 software program (Statsoft Inc. Tulsa, OK, USA). Differences between groups were considered statistically significant when the probability by chance was less than 5% ($P < 0.05$). CBG-binding capacity analyses were performed on Graphpad Prism 3.0 software. All experiments were performed in duplicate to confirm the results.

Results

Total and Free Cort levels in the serum after a severe burn injury

The serum total Cort level in burn-treated mice were significantly higher (237 % and 220 %) after day 1 and 2 respectively, following a burn injury when compared to levels measured in buprenorphine-treated mice. We have noted a significant increase (165 %) in total Cort measured in buprenorphine-treated mice 5 days after burn injury while values for the burn group were already decreasing. Then, we observed a gradual decrease in total Cort levels for both buprenorphine and burn-treated mice and values were similar between the two groups 10 days post-burn. The burn injury induced a significant increase (221 % and 209 %) in free Cort % observed at day 1 and 2 with values that peaked at 17% for burned mice while control levels were at 8%. After the second day post-burn, free cort % levels were comparable in burn and sham-treated mice with values ranging between 5 and 7%. Because the amount of free Cort in the serum is calculated by multiplying total Cort values by free Cort %, we have observed that the burn injury caused a significant and major increase of free Cort levels, respectively (447% and 450%) at day 1 and 2 post-burn.

Hepatic CBG mRNA expression after a severe burn injury

We next wanted to test the hypothesis that the burn injury, by stimulating HPA-axis and Cort production, had an effect on CBG mRNA expression in the liver, where the protein is mainly produced. Northern blot analyses were conducted to determine the effect of burn injury on hepatic CBG mRNA expression. As shown in figure 2A, we found a significant reduction of CBG mRNA expression 24 hours following a burn injury. Similar

results were observed 12 hours after burn injury (data not shown). However, CBG mRNA levels in the liver were similar to control levels on day 2 following burn injury and we have not observed any significant differences between sham- and burn-treated mice for the rest of the study period as visualized in figure 2B. These data suggest that high serum Cort levels, resulting from a severe burn injury, can decrease hepatic CBG mRNA expression and that the reduction of CBG mRNA expression in the liver results in a decrease in CBG protein production, thus explaining free Cort changes following a burn injury.

CBG binding capacity

In order to verify if Cort transport in the plasma was modulated by burn injury, we did a saturation binding assay of plasma proteins where the saturation point of the curve represents the B_{max} or maximum binding capacity. Figures 3A and 3B clearly demonstrate that the binding capacity of plasma proteins for Cort was altered by the burn injury. In fact, the saturation point was reached at lower concentrations in the burn-treated mouse when compared to plasma from a typical sham treated mause. Because CBG is the main Cort carrier in the plasma, we assume that a change in the binding capacity was ptimarily the result of CBG binding properties. Figure 3C shows that the CBG binding capacity was significantly reduced (55% and 47% less) at day 1 and day 2 following a burn injury and that subsequently, CBG binding capacity returned to control values.

Plasma CBG levels measured by Western Blot

Having established that plasma proteins, mainly CBG binding capacity was decreased on day 1 and day 2 following burn injury, western blot analyses of mice serum were conducted in order to determine CBG concentration change in the serum. Figure 4A clearly demonstrates that CBG levels in the burn group are similar to control levels 12 hours post-burn but rapidly decreased at day 1 and day 2 following burn injury. CBG levels in burned mice serum returned to control values at day 5 post-burn. Figure 4B shows the quantification results expressed as arbitrary units relative to sham group as the mean intensity of the signal per group. This figure shows that CBG concentration is highly decreased at day 1 and day 2 in burned mice serum and that it returned to control values at day 5 post-burn injury.

Thymus phenotypic analysis after burn injury

It is well known that high Cort levels can affect thymocyte proliferation causing thymus atrophy. Thus, to demonstrate this, we had to determine thymus cellularity at different time intervals following a burn injury. Figure 5A shows that thymus cellularity is affected by the burn injury and results in a significant reduction (41% and 50%) in the number of thymocytes respectively at day 1 and day 2 post-burn. The decrease was mainly caused by a reduction in double-positive CD4+/CD8+ immature thymocytes which constitute the major thymic sub-population, exemplified by the concomitant expression of CD4 and CD8 cell surface markers. In fact, figure 5B shows that the % of $CD4^+/CD8^+$ T cells was significantly reduced (25% and 20%) respectively at day1 and day2 post-burn with values ranging between 60 and 65% In contrast, in sham treated animals we observed values

ranging between 80 and 85 %. As shown in figure 5C, in absolute numbers, this reduction equals in a significant loss of $40x10^6$ and $38x10^6$ of double-positives $CD4^+/CD8^+$ cells, respectively at day1 and day2 post-burn. To confirm our results, we did a specific thymocyte analysis by targeting both the CD24 and Qa.2 cell surface markers: the first is expressed only on immature T cells, the second is expressed by the most mature thymocytes. It is evident from figures 6A and 6B that both $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells expressing the CD24 marker were depleted following burn injury. In fact, at day 1 post-burn we observed an important decrease of $CD4^+/CD24^+$ T cells (45×10^6 cells, representing 50% less cells), although this was not significant P= 0.09. But at day 2 post-burn, the same difference existed between buprenorphine and burn-treated animals with respect to $CD4^+/CD24^+$ T cells with a significant 50% reduction in cell numbers which represents a loss of 35×10^6 immature cells. When we looked at T cells expressing $CD8^+/CD24^+$ surface markers, we observed similar results as seen with $CD4^+/CD24^+$, with a highly significant loss of cells (42×10^6 and 30×10^6) representing a 50% reduction of cells for both day 1 and day 2 post-burn. However, the changes observed with immature T cells, was not seen when phenotyping mature thymocytes. In fact, there were no significant differences observed in both $CD4^+/Qa.2^+$ and $CD8^+/Qa.2^+$ mature T cells sub-populations when comparing thymus from sham and burn-treated mice at day1 and day2 post-burn. Having now established that both the endocrine an the immune systems were affected by the burn injury, we then wanted to correlate the two parameters that changed the most after the burn injury. Thus, Figure7 shows the result of a correlation made between free Cort and the absolute number of immature double-positive T cells expressing both CD4 and CD8 markers. The graph indicates that a strong

relationship exists between the two parameters and that the reduction of immature cells is explained mainly by the modulation of free Cort levels in the plasma.

Discussion

A severe burn injury causes an elevation in total serum Cort by activating, in multiple ways, the HPA-axis. In the present study, we demonstrate that CBG is the main regulator for Cort availability in plasma and tissues and that decreased hepatic CBG mRNA expression followed by a depletion of the transporter in the plasma are primarily responsible for high Cort levels which cause a direct effect on thymic involution. Induction of Cort production was rapid, high rising Cort levels were seen as early as 24 hours after the burn injury but lasted only for another 24-48 hours and then decreased gradually below control values by day 5 and returned to control levels 10 days following the burn injury. The fact that we observe higher total Cort levels at day 5 for the control group is explained by the administration of buprenorphine to mice. In fact, this opiate, in contrast to morphine, does not immediately activate the HPA-axis but represses Cort production early (1 to 6 hours) after its administration (37-39). Indeed, it has a more slow-going activity observable essentially at 5 days following a burn injury. Incidentally, total Cort levels observed for burn mice 5 days post-burn would have been lower if it was not for the stimulatory effect of the drug on HPA-axis at that time. The percentage free Cort increased rapidly as we observed peak values 2 days following burn injury and then these progressively returned to control values and remained at approximately 5-7% throughout the experimental period. % free Cort variation was the biggest contributor to free Cort level variations because it multiplied the variations seen previously in total Cort values. Indeed, we observed that free Cort levels were 400 to 500 % higher in burned mice between days 1 and 2 following burn injury and that these reached normal values at

day 5 (30-70 pMol/100ul of serum). The increase observed in the degree of freedom of Cort can be explained by a rapid and sustained decrease of hepatic CBG mRNA expression between 12 and 24 hours following burn injury. In fact, decreased CBG mRNA levels in the liver preceded total Cort increase. This created a gap in time between increasing Cort levels and decreasing plasmatic CBG concentration which explains the spectacular increase in free Cort levels observed between day 1 and 2 post-burn. High circulating Cort levels are believed to act negatively and transiently on the expression of CBG gene in the liver immediately following the burn injury thus increasing free biologically active Cort levels (40-41). Although no response element for GC was found in murine CBG gene, it is believed that GR may repress transcription via physical interactions with other transcription factors such as hepatic nuclear factor-1 (HNF-1) (42). In addition to Cort effect on CBG gene expression, increasing levels of IL-6 which arise following a burn injury (43-44) could explain the sustained repression of CBG production. Several studies have pointed out this relationship (45-46). Thus, IL-6 may act directly on a specific binding site (NF-1IL6) found in rat and human CBG promoter or in association with transcription factors to regulate hepatic CBG production (47). Bartalena et al. (48) suggested that IL-6 could affect CBG mRNA stability by a post-transcriptional mechanism.

It is believed that plasma CBG goes through a serpin conformational change during inflammation (49). In fact, CBG is cleaved by elastase a protease released at high concentrations at inflammation sites (50). This, in addition to reduced hepatic CBG

mRNA expression, may explain a low binding capacity of CBG for Cort occurring 24 to 48 hours post-burn injury resulting in high free biologically active Cort.

It is important to point out that the decrease in CBG observed in burn mice should not have resulted in an increase in free Cort if the negative feedback on adrenocorticotropin secretion was normal. This impaired negative feedback was observed in patients with sepsis during dexamethasone infusion; the same situation can be hypothesized for our mice (51).

GC are secreted in large amounts in response to stressful stimuli and have a potent action on the thymus. In fact, while no observable changes occurred 12 hours after the burn injury, we have observed a transient thymic involution (reversible loss of thymus mass) at days 1 and 2. This loss of 50% of total thymocytes was mainly caused by a depletion of double-positive (DP) $CD4^+/CD8^+$ T cells. Indeed, at day 1 and 2 post-burn, a significant drop of DP cells number (60 to 65 %) was noted in burned mice which later reached control levels that varied between 80 and 85 % during the experiment period. Furthermore, phenotyping results indicate a selective depletion of immature T cells positive for the CD24 cell surface marker or Heat-stable antigen (HSA) which include DP T-cell population as well as a variety of intermediate immature T-cell subpopulations (52). On the other hand, no changes between control and burn groups were observed on mature T-cells characterised by the Qa.2 cell surface marker.

Several causes can explain the transient thymic involution which occurs between day 1 and 2 post-burn. Firstly, DP T cells are known to be cortico-sensitive. Indeed, DP T cells numbers are negatively correlated with increasing free biologically active Cort at day 1 post-burn. Normally, T cell selection in the thymus occurs when both TCR and GC mediated signals antagonize each other, thus establishing a T cell repertoire effective against non-self antigens (53). High endogenous Cort levels can disrupt T cell selection and direct immature thymocyte to apoptosis. GC induced thymocyte apoptosis is mediated by the mitochondrial pathway and requires Apaf-1 complex formation and capsase-9 (54). Also, Fukuzuka et al. (2000) observed that thymus atrophy following a burn injury was accompanied by increased FasL and caspase-3 activity and was greatly reduced by pre-treatment with Mifepristone, a Cort receptor blocking agent (55). Secondly, a reduced repopulation of thymus by precursor T cells from the bone marrow could explain the selective loss of immature cells. In fact, in a chronic immobilization stress situation, it was previously demonstrated that a reduction in the number of T-cell precursors and in thymic T-cell chemo-attractants were partially responsible for thymic involution (56). Thirdly, a reduced proliferation of DP T cells could explain low numbers of immature cells at that moment. In fact, DP thymic T cells are known to be highly proliferative and it was previously established that thymus involution was associated with GC treatment which decreased thymocyte proliferation (57-58).

Overall, our results demonstrate for the first time, that CBG is the main in vivo regulator of Cort action on cortico-sensible thymocytes following a burn injury. It is clear that the stress induced by the injury had a negative impact on hepatic CBG mRNA expression

which preceded the depletion of circulating plasma CBG levels resulting in a reduced binding capacity for Cort. This, concomitant with rising Cort secretion in response to the injury accentuated free Cort levels. The latter, had an impact on cortico-sensible cells, immature thymic T-cells, causing a thymus involution. Glucocorticoids are also known to contribute to T cell selection and high Cort levels could impair negative and positive selection occurring in the thymus. This would result in the selection and maturation of auto-reactive or defective T cell clones which could later impair the recovery of patients suffering from burn injury.

References

1. Harris BH, Gelfand JA 1995 The immune response to trauma. Semin Pediatr Surg 4:77-82

2. Moran K, Munster AM 1987 Alterations of the host defense mechanism in burned patients. Surg Clin North Am 67:47-56

3. Allgower M, Schoenenberger GA, Sparkes BG 1995 Burning the largest immune organ. Burns 21:7-47

4. Faist E, Kupper TS, Baker CC, Chaudry IH, Dwyer J, Baue AE 1986 Depression of cellular immunity after major injury. Its association with posttraumatic complications and its reversal with immunomodulation. Arch Surg 121:1000-1005

5. Barlow Y. 1994 T lymphocytes and immunosuppression in the burned patient: a review. Burns. 20:487-490

6. Teodorczyk-Injeyan JA, Cembrzynska-Nowak M, Lalani S, Peters WJ, Mills GB 1995 Immune deficiency following thermal trauma is associated with apoptotic cell death. J Clin Immunol 15:318-328

7. Nagata S, Golstein P 1995 The Fas death factor. Science 267:1449-1456

8. Wang SD, Huang KJ, Lin YS, Lei HY 1994 Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. J Immunol 152:5014-5021

9. Van de Craen M, Vandenabeele P, Declercq W, Van den Brande I, Van Loo G, Molemans F, Schotte P, Van Criekinge W, Beyaert R, Fiers W 1997 Characterization of seven murine caspase family members. FEBS Lett 403:61-69

10. Poccia F, Piselli P, Vendetti S, Bach S, Amendola A, Placido R, Colizzi V 1996 Heat-shock protein expression on the membrane of T cells undergoing apoptosis. Immunology 88:6-12

11. Fukuzuka K, Edwards CK 3rd, Clare-Salzler M, Copeland EM 3rd, Moldawer LL, Mozingo DW 2000 Glucocorticoid-induced, caspase-dependent organ apoptosis early after burn injury. Am J Physiol Regul InteGR Comp Physiol 278:1005-1018

12. Spath-Schwalbe E, Born J, Schrezenmeier H, Bornstein SR, Stromeyer P, Drechsler S, Fehm HL, Porzsolt F 1994 Interleukin-6 stimulates the hypothalamus-pituitary-adrenocortical axis in man. J Clin Endocrinol Metab 79:1212-1214

13. Perlstein RS, Whitnall MH, Abrams JS, Mougey EH, Neta R 1993 Synergistic roles of interleukin-6, interleukin-1, and tumor necrosis factor in the adrenocorticotropin response to bacterial lipopolysaccharide in vivo. Endocrinology 132:946-952

14. Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS 2000 Glucocorticoids in T cell development and function. Annu Rev Immunol. 18:309-345

15. Gruber J, Sgonc R, Hu YH, Beug H, Wick G. 1994 Thymocyte apoptosis induced by elevated endogenous corticosterone levels. Eur J Immunol 24:1115-1121

16. Gillis S, Crabtree GR, Smith KA 1979 Glucocorticoid-induced inhibition of T cell GRowth factor production. I. The effect on mitogen-induced lymphocyte proliferation. J Immunol 123:1624-1631

17. Ranelletti FO, Maggiano N, Aiello FB, Carbone A, Larocca LM, Musiani P, Piantelli M 1987 Glucocorticoid receptors and corticosensitivity of human thymocytes at discrete stages of intrathymic differentiation. J Immunol 138:440-445

18. Vacchio MS, Papadopoulos V, Ashwell JD 1994 Steroid production in the thymus: implications for thymocyte selection. J Exp Med 179:1835-1846

19. Lechner O, Wiegers GJ, Oliveira-Dos-Santos AJ, Dietrich H, Recheis H, Waterman M, Boyd R, Wick G 2000 Glucocorticoid production in the murine thymus. Eur J Immunol 30:337-346

20. Lechner O, Dietrich H, Wiegers GJ, Vacchio M, Wick G 2001 Glucocorticoid production in the chicken bursa and thymus. Int Immunol 13:769-776

21. Pazirandeh A, Xue Y, Rafter I, Sjovall J, Jondal M, Okret S. 1999 Paracrine glucocorticoid activity produced by mouse thymic epithelial cells. FASEB J 13:893-901

22. Vacchio MS, Lee JY, Ashwell JD 1999 Thymus-derived glucocorticoids set the thresholds for thymocyte selection by inhibiting TCR-mediated thymocyte activation. J Immunol 163:1327-1333.

23. Wiegers GJ, Knoflach M, Bock G, Niederegger H, Dietrich H, Falus A, Boyd R, Wick G 2001 CD4(+)CD8(+)TCR(low) thymocytes express low levels of glucocorticoid receptors while being sensitive to glucocorticoid-induced apoptosis. Eur J Immunol 31:2293-2301.

24. Siiteri PK, Murai JT, Hammond GL, Nisker JA, Raymoure WJ, Kuhn RW 1982 The serum transport of steroid hormones. Recent Prog Horm Res 38:457-510

25. Fleshner M, Deak T, Spencer RL, Laudenslager ML, Watkins LR, Maier SF 1995 A long-term increase in basal levels of corticosterone and a decrease in corticosteroid-binding globulin after acute stressor exposure. Endocrinology 136:5336-5342

26. Cole TJ, Harris HJ, Hoong I, Solomon N, Smith R, Krozowski Z, Fullerton MJ 1999 The glucocorticoid receptor is essential for maintaining basal and dexamethasone-induced repression of the murine corticosteroid-binding globulin gene. Mol Cell Endocrinol 154:29-36

27. Bartalena L, Hammond GL, Farsetti A, Flink IL, Robbins J 1993 Interleukin-6 inhibits corticosteroid-binding globulin synthesis by human hepatoblastoma-derived (Hep G2) cells. Endocrinology 133:291-296

28. Bernier J, Jobin N, Emptoz-Bonneton A, Pugeat MM, Garrel DR 1988 Decreased corticosteroid-binding globulin in burn patients: relationship with interleukin-6 and fat in nutritional support. Crit Care Med 26:452-460

29. Pemberton PA, Stein PE, Pepys MB, Potter JM, Carrell RW 1988 Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation. Nature 33:257-258

30. Hammond GL, Smith CL, Paterson NA, Sibbald WJ 1990 A role for corticosteroid-binding globulin in delivery of cortisol to activated neutrophils. J Clin Endocrinol Metab 71:34-39.

31. Jobin N, Garrel DR, Bernier J 2000 Increased burn-induced immunosuppression in lipopolysaccharide-resistant mice. Cell Immunol 200:65-75

32. Jobin N, Garrel DR, Champoux J, Bernier J 2000 Improved immune functions with administration of a low-fat diet in a burn animal model. Cell Immunol 206:71-84

33. Newsome HH Jr, Clements AS, Borum EH 1972 The simultaneous assay of cortisol, corticosterone, 11-deoxycortisol, and cortisone in human plasma. J Clin Endocrinol Metab 34:473-483

34. Hammond GL, Nisker JA, Jones LA, Siiteri PK 1980 Estimation of the percentage of free steroid in undiluted serum by centrifugal ultrafiltration-dialysis. J Biol Chem 255:5023-5026

35. Hammond GL, Lahteenmaki PL 1983 A versatile method for the determination of serum cortisol binding globulin and sex hormone binding globulin binding capacities. Clin Chim Acta 132:101-110

36. Scrocchi LA, Orava M, Smith CL, Han VK, Hammond GL 1993 Spatial and temporal distribution of corticosteroid-binding globulin and its messenger ribonucleic acid in embryonic and fetal mice. Endocrinology 132:903-909

37. Rolandi E, Marabini A, Franceschini R, Messina V, Bongera P, Barreca T. 1983 Changes in pituitary secretion induced by an agonist-antagonist opioid drug, buprenorphine. Acta Endocrinol (Copenh) 104:257-260

38. Moore RA, Smith RF, McQuay HJ, Bullingham RE 1981 Sex and surgical stress. Anaesthesia 36:263-267

39. Gomez-Flores R, Weber RJ 2000 Differential effects of buprenorphine and morphine on immune and neuroendocrine functions following acute administration in the rat mesencephalon periaqueductal GRay. Immunopharmacology 48:145-156

40. Smith CL, Hammond GL 1992 Hormonal regulation of corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the male rat. Endocrinology 130:2245-2251

41. Hammond GL, Smith CL, Underhill DA 1991 Molecular studies of corticosteroid binding globulin structure, biosynthesis and function. J Steroid Biochem Mol Biol 40:755-762

42. Zhao XF, Underhill DA, Hammond GL 1997 Hepatic nuclear proteins that bind cis-regulatory elements in the proximal promoter of the rat corticosteroid-binding globulin gene. Mol Cell Endocrinol 126:203-212

43. Guo Y, Dickerson C, Chrest FJ, Adler WH, Munster AM, Winchurch RA 1990 Increased levels of circulating interleukin 6 in burn patients. Clin Immunol Immunopathol 54:361-371

44. Nijsten MW, de GRoot ER, ten Duis HJ, Klasen HJ, Hack CE, Aarden LA. 1987 Serum levels of interleukin-6 and acute phase responses. Lancet 17:921

45. Beishuizen A, Thijs LG, Vermes I 2001 Patterns of corticosteroid-binding globulin and the free cortisol index during septic shock and multitrauma. Intensive Care Med 2001 27:1584-1591

46. Bernier J, Jobin N, Emptoz-Bonneton A, Pugeat MM, Garrel DR 1998 Decreased corticosteroid-binding globulin in burn patients: relationship with interleukin-6 and fat in nutritional support. Crit Care Med 26:452-460

47. Emptoz-Bonneton A, Crave JC, LeJeune H, Brebant C, Pugeat M. 1997 Corticosteroid-binding globulin synthesis regulation by cytokines and glucocorticoids in human hepatoblastoma-derived (HepG2) cells. J Clin Endocrinol Metab 82:3758-3762

48. Bartalena L, Hammond GL, Farsetti A, Flink IL, Robbins J. 1993 Interleukin-6 inhibits corticosteroid-binding globulin synthesis by human hepatoblastoma-derived (Hep G2) cells. Endocrinology 133:291-296

49. Pemberton PA, Stein PE, Pepys MB, Potter JM, Carrell RW 1988 Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation. Nature 336:257-258

50. Hammond GL, Smith CL, Paterson NA, Sibbald WJ 1990 A role for corticosteroid-binding globulin in delivery of cortisol to activated neutrophils. J Clin Endocrinol Metab 71:34-39

51. Moran JL, Chapman MJ, O'Fathartaigh MS, Peisach AR, Pannall PR, Leppard P. Hypocortisolaemia and adrenocortical responsiveness at onset of septic shock. Intensive Care Med. 1994 20:489-495

52. Teh HS, Motyka B, Teh SJ 1998 Positive selection of thymocytes expressing the same TCR by different MHC ligands results in the production of functionally distinct thymocytes distinguished by differential expression of the heat stable antigen. J Immunol 1998 160:718-727

53. Vacchio MS, Lee JY, Ashwell JD 1999 Thymus-derived glucocorticoids set the thresholds for thymocyte selection by inhibiting TCR-mediated thymocyte activation. J Immunol 163:1327-1333

54. Chao DT, Linette GP, Boise LH, White LS, Thompson CB, Korsmeyer SJ. 1995 Bcl-XL and Bcl-2 repress a common pathway of cell death. J Exp Med 182:821-828

55. Fukuzuka K, Edwards CK 3rd, Clare-Salzler M, Copeland EM 3rd, Moldawer LL, Mozingo DW 2000 Glucocorticoid-induced, caspase-dependent organ apoptosis early after burn injury. Am J Physiol Regul InteGR Comp Physiol 278:1005-1018

56. Dominguez-Gerpe L, Rey-Mendez M 2000 Role of pre-T cells and chemoattractants on stress-associated thymus involution. Scand J Immunol 52:470-476

57. Barone KS, O'Brien PC, Stevenson JR 1993 Characterization and mechanisms of thymic atrophy in protein-malnourished mice: role of corticosterone. Cell Immunol 148:226-233

58. Kim TJ, Kinoshita Y, Hato F, Kimura S 1990 Rat thymus reconstitution after thymocyte destruction by glucocorticoid treatment--from the view of endogenous DNA synthesis and soybean lectin responsiveness in thymocytes. Cell Mol Biol 36:705-716

Legend of figures

Figure. 1. Serum total Cort (A), free Cort % (B) and free Cort (C) levels at selected time intervals after sham (■) or burn injury (▲). In A, the figure shows that on day 1 and 2, burn injury significantly increased total serum Cort concentration while buprenorphine alone increased total Cort on day 5. Values were similar for both groups on day 10. Free Cort % was significantly increased for the first 2 days after burn injury. Therefore, free Cort levels were significantly higher in the burn group at day 1 and 2 post-burn and free Cort levels returned to control values past this period. (N = 5 mice/group). **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$ (vs sham group, by ANOVA test). Each *square* or *triangle* and *vertical line* represent the mean for a group (+/- SEM).

Figure. 2. CBG gene expression in the liver at selected time-intervals after sham (white) or burn injury (dark grey). Figure A and B show Northern blot results for CBG and 18s mRNAs hybridization after 1 and 5 days, in liver samples from sham and burn-treated mice. The intensities of the CBG mRNA bands on blots were quantified and normalized based on the intensities of 18S. Figure C shows quantitation results for CBG mRNA expressed in comparison to buprenorphine values (100 %). We noted a significant decrease in the expression of CBG gene for the first 24 hours after burn injury. There were no significant differences observed between the two groups after day 1 post-burn. The *bars* represent the mean (+\- SEM) for one group (N = 5 mice/group). *, $P < 0.05$ (vs sham group, by ANOVA test).

Figure. 3. CBG binding capacity in C57BL/6 male mice serum after sham (■) or burn injury (▲). Figure A and B show typical saturation binding assay results, where one sample from each group, was analyzed on Graphpad Prism. A Scatchard conversion is used to extrapolate the x-intercept which represents the Bmax or the saturation point. Figure C demonstrates that CBG binding capacity is significantly reduced in serum between day 1 and 2 after burn injury. Each square or triangle and vertical line represent the mean for a group (+\- SEM). *, $P < 0.05$ (vs sham group, by ANOVA test)

Figure. 4. Western blots of mouse serum proteins at different time-intervals after sham (white) or burn injury (dark grey). Serum was diluted 1:100 and assayed for protein content by Bradford colorimetric assay. Serum was furthermore diluted 1:10 to equally adjust protein concentrations to be loaded. Serum samples were resolved by 10 % SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane, and developed with CBG antiserum (1:500 dilution). Western blot results demonstrate that CBG protein concentration is markedly decreased in the serum of mice at day 1 and 2 following a burn injury. Figure B shows quantitation results, the *bars* represent the relative intensity (O.D.) evaluated as the % of buprenorphine intensity (+\- SEM).

Figure. 5. Thymus analysis after sham (■) or burn injury (▲). Figure 5A shows that thymus cellularity was increased immediately after micro-osmotic pump installation. However, we observed a rapid decrease of thymocyte cellularity being significant 2 days after burn injury ($p< 0.05$). Fig.5B demonstrates that the variations of cellularity observed at day 1 and 2 post-burn are accompanied by a marked reduced expression of $CD4^+/CD8^+$ thymocytes . Moreover, between day 1 and 2 post-burn we observed a significant decrease ($p< 0.05$) of double-positive $CD4^+/CD8^+$ T cells (Fig. 5C).

Figure. 6. Thymus sub-population analysis 1 and 2 days after sham (white) or burn injury (dark grey). Figure 6A and 6B show a significant decrease in immature $CD24^+$ T cells for both $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell populations. No significant differences were observed for the most mature thymic cells characterized by the Qa.2 cell surface marker expression. Each band and vertical line represent the mean for a group (+/- SEM). ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ (vs sham group, by ANOVA test)

Figure. 7. Multiple regression analysis between free corticosterone and total double-positive $CD4^+/CD8^+$ immature T-cells, 1 day after burn injury. A strong relationship exists between the two parameters whereas Free Cort variations is responsible for 66,42 % of double-positive $CD4^+/CD8^+$ thymocytes number variation ($p = 0.0041$).

Figure 1. D'Elia M. *et al.*

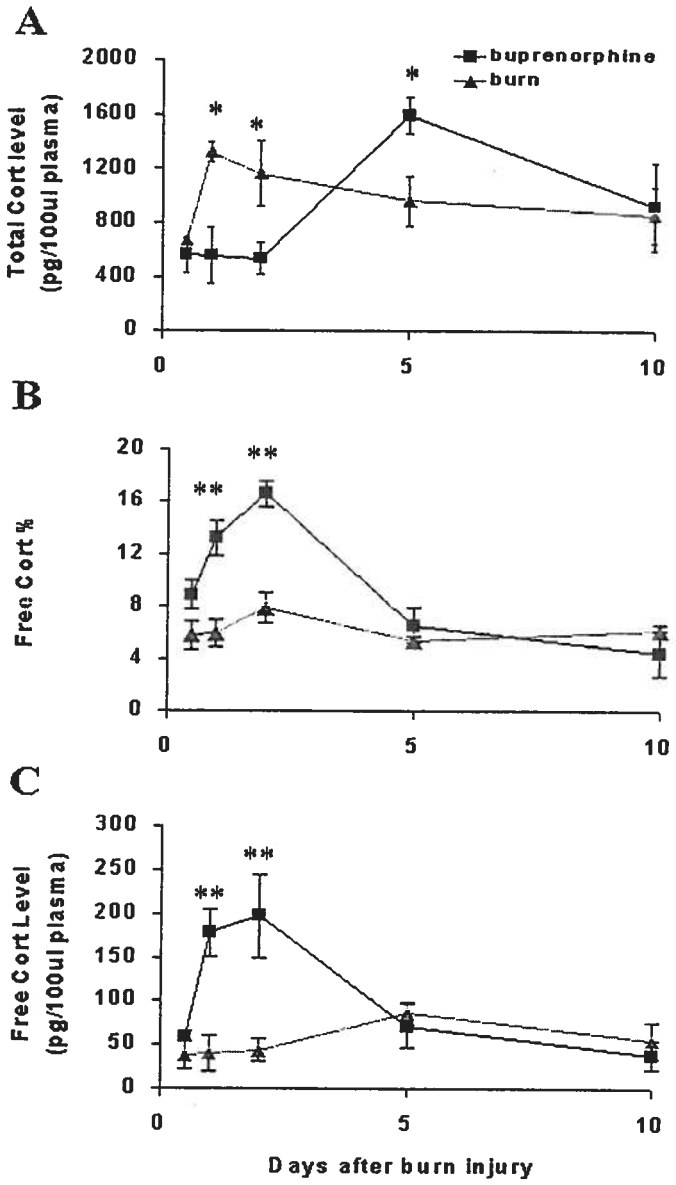


Figure 2. D'Elia M. *et al.*

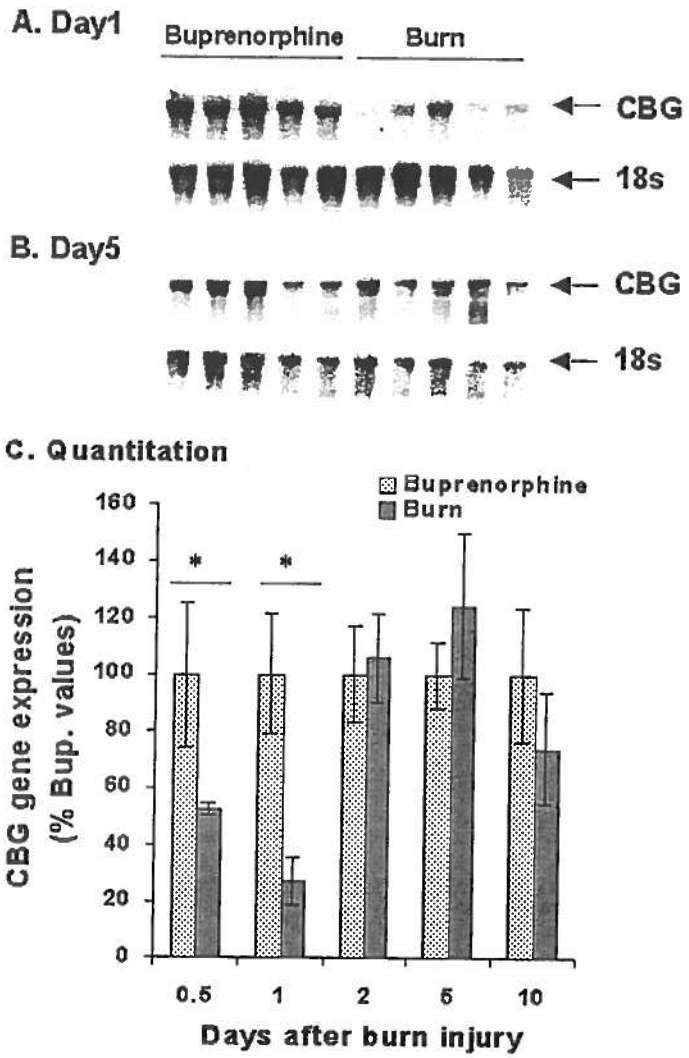


Figure 3. D'Elia M. *et al.*

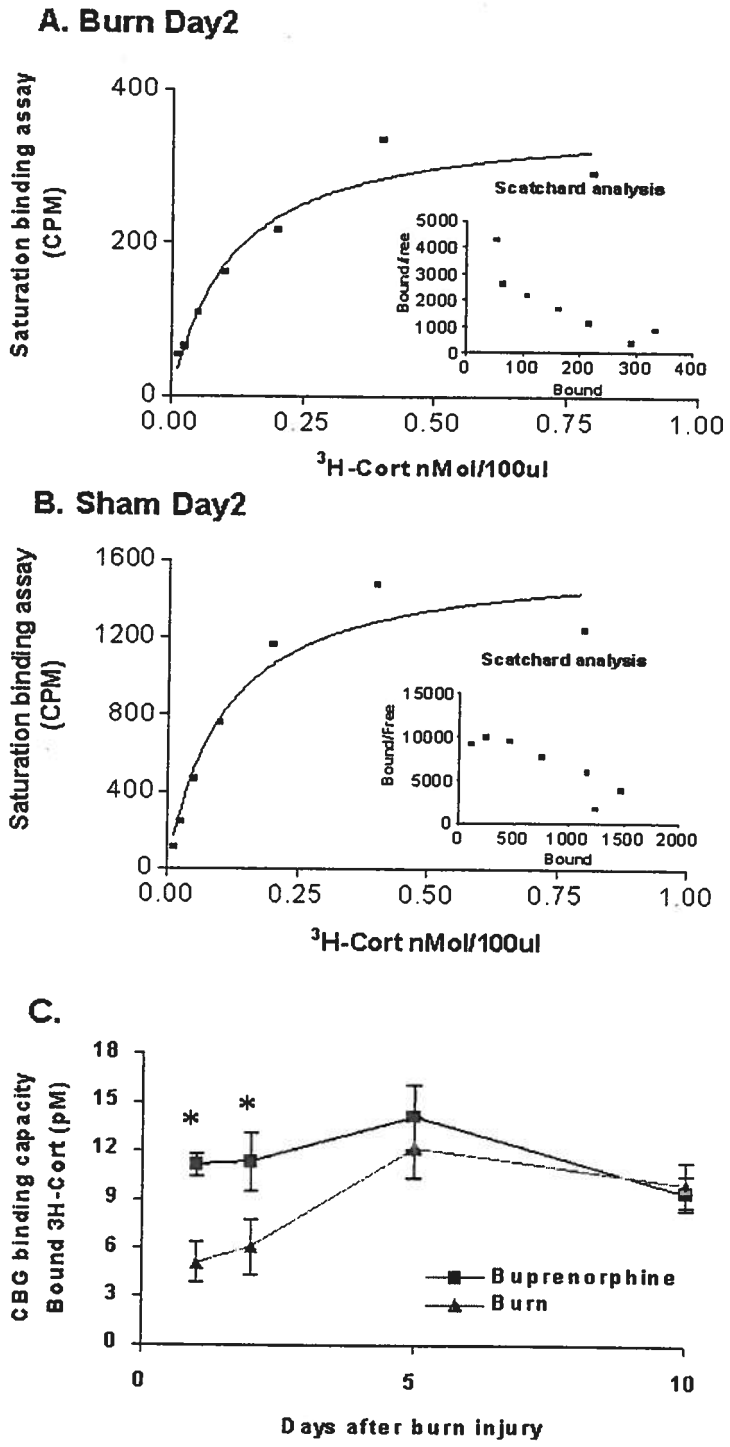


Figure 4. D'Elia M. *et al.*

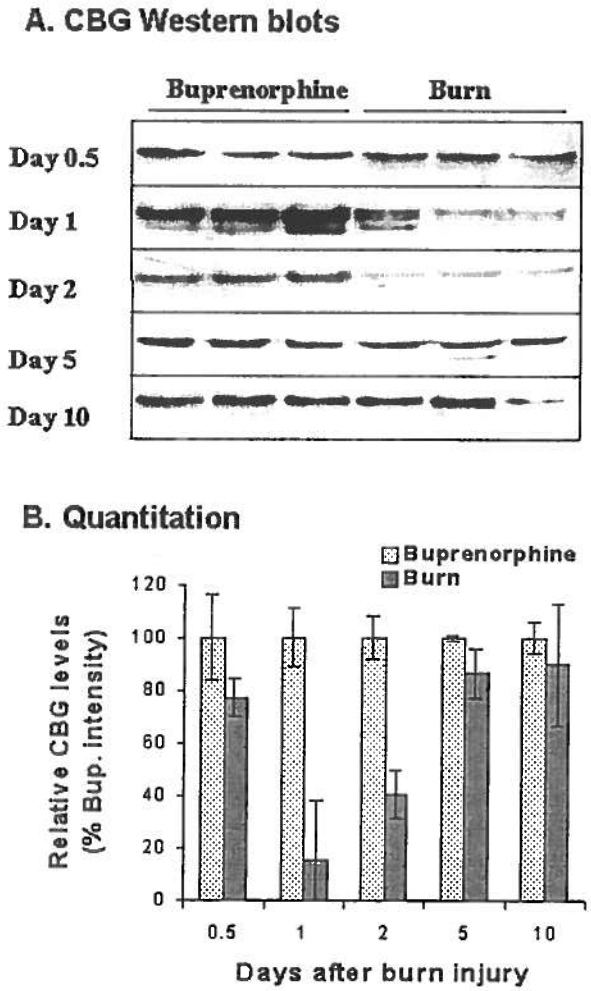


Figure 5. D'Elia M. *et al.*

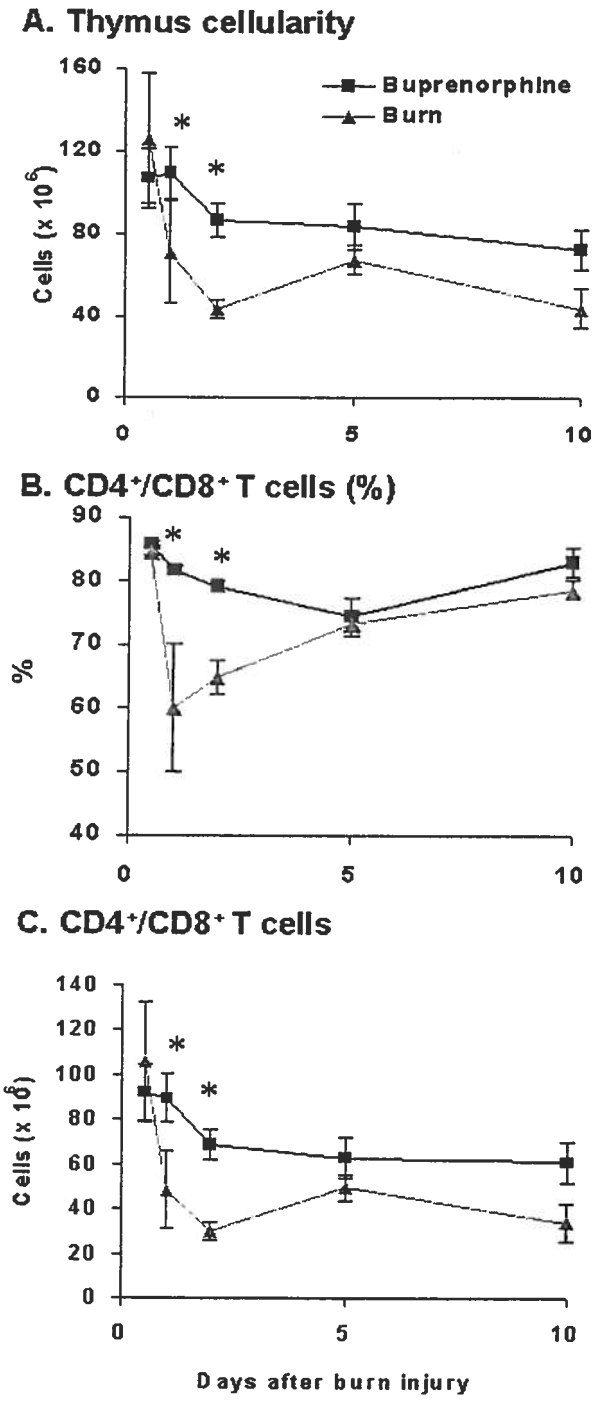


Figure 6. D'Elia M. *et al.*

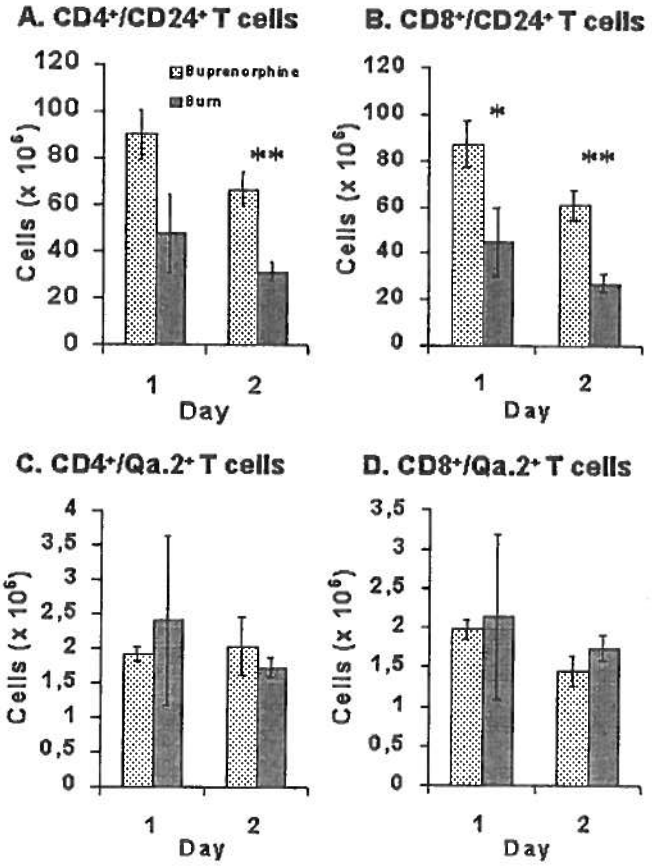
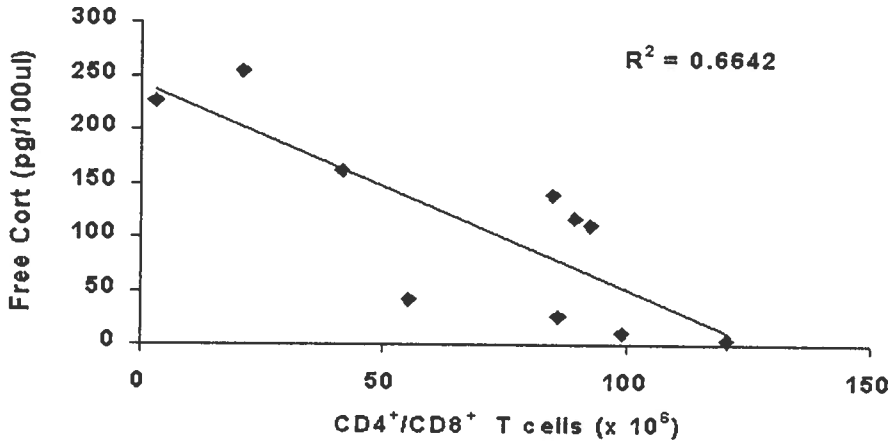


Figure 7. D'Elia M. *et al.*



Troisième partie

Discussion/Conclusion

Le traitement de la douleur chez les patients gravement brûlés est une pratique essentielle et nécessaire en milieu hospitalier pour favoriser le rétablissement de l'organisme. Étant donné les effets connus des opiacés sur les systèmes endocrinien et immunitaire, il nous a fallu discriminer l'effet de la Bup de celui de la brûlure sévère sur la production d'hormones de stress, de CBG et l'impact de leur régulation mutuelle sur la maturation des thymocytes. De plus, aucune étude n'avait encore évalué l'influence d'une exposition prolongée et contrôlée de Bup sur les réponses endocrinienne et immunitaire. Conjointement, ces deux raisons justifiaient notre intérêt à étudier l'effet de cette drogue.

À la lumière de nos résultats, l'implantation d'une pompe osmotique dans la cavité péritonéale induit à elle seule, une légère augmentation du Cort total en réponse au stress de la manipulation chirugicale. Ainsi, les souris du groupe saline montrèrent des niveaux de Cort total deux fois plus élevés que ceux mesurés chez une souris à l'état normal. Par ailleurs, les souris traités avec de la Bup. sont réfractaires au stress causé par l'intervention chirurgicale. Nous avons observé des niveaux de Cort total inférieur chez nos souris traitées avec la drogue. 2 autres études sont arrivées au mêmes conclusions. La première, de Pende *et al.* (1986) qui remarquèrent à la suite d'une injection de Bup à des patients une diminution de la réponse endocrienienne au stress démontrée par la baisse des niveaux plasmatiques d'ACTH et de Cort. La seconde, de Gomez-Flores *et al.* (2000) qui observèrent un tel phénomène déjà rapporté chez des patients.

Les niveaux de Cort mesurés chez les souris traitées augmentèrent graduellement et rejoignirent ceux observés chez les souris du groupe saline. Cette faible variation des niveaux de l'hormone qui s'effectua sur une période de 10 jours ne causa pas de changements au niveau du transporteur spécifique. Cette situation fut évoquée dans une étude qui démontra que de faibles variations journalières en Cort plasmatique total et libre reliées au rythme circadien de l'organisme, n'affectaient pas les niveaux de CBG, qui eux demeuraient constants (Hsu et Kuhn, 1988). La Bup n'eut aucun effet sur les niveaux de CBG dans le sang, sur l'expression de son ARNm dans le foie ni même sur sa capacité de

liaison dans le plasma. Or, la régulation des niveaux de Cort libre fut attribuée conjointement, par la production de glucocorticoides et par leur liaison dans le plasma avec la CBG (Rosner W, 1991).

Dans notre étude, nous avons observé des niveaux stables du pourcentage de Cort libre pour les souris des deux groupes confondus. Ceci vient directement confirmer notre observation sur la capacité de liaison de la CBG qui était demeurée constante tout au long de l'expérience. Par ailleurs, la régulation du système Cort/CBG par la morphine fut évaluée par l'équipe de Nock *et al.* (1997). Ils démontrèrent une augmentation dose-dépendante de la CBG chez des rats exposés à la morphine sans toutefois définir un effet de la drogue sur les niveaux de Cort total. L'utilisation de naltrexone, un antagoniste multiple des récepteurs aux opiacés, bloquait l'effet de la morphine sur l'élévation des niveaux de CBG. Cette situation a causé une diminution substantielle des niveaux de Cort libre, biologiquement actif. Des niveaux élevés de CBG observés lors de l'administration de morphine sont responsables d'une plus grande séquestration de l'hormone, ce qui peut affecter la réponse au stress. En ce qui nous concerne, nous avons démontré que la Bup agissait d'une manière différente, car elle n'affectait ni la production ni la capacité de liaison de la CBG ainsi, un changement dans la quantité de Cort libre, demeure toujours relié à une modulation dans la production de l'hormone.

Préalablement à notre étude, l'effet négatif de la majorité des opiacées sur le système immunitaire avait été démontré dans de nombreuses études. Bryant *et al.* (1988) avaient observé une atrophie de la rate et du thymus accompagnée d'une réduction de la capacité proliférative des splénocytes en réponse à une stimulation avec la Concanavalin-A (Con-A) chez des souris traitées à la morphine. Divers effets immunosuppressifs tels qu'une baisse de l'activité cytotoxique des cellules NK, de la prolifération des cellules T et de la production d'interféron-gamma (IFN-γ) furent observés chez des rats traités avec de la morphine. (West *et al.*, 1998 ; Tsai *et al.*, 2000). Il fut proposé par Freier et Fuchs (1994) que l'effet immunosuppressif de la morphine était lié à une augmentation de l'activité de l'axe HPA. Contrairement aux autres opiacés, l'utilisation de la Bup s'est avérée plus sûre sur le système immunitaire. La drogue ne causa pas de changements au niveau de la

cellularité de la rate et du thymus ni même au niveau des différentes sous-populations cellulaires. Par ailleurs, nous avons observé une augmentation de la prolifération des splénocytes au jour 5, cette situation fut d'ailleurs évoquée dans une étude précédante où des souris femelles C3H étaient soumises au même traitement (Jobin *et al.*, 2000). Cette observation fut ponctuelle et des valeurs comparables ont été mesurées entre les souris des deux groupes au 10e jour d'exposition. De plus, comme nous n'avons pas observé de changements au niveau du Cort total et de la CBG, l'effet observé au jour 5 ne semblait pas être relié à l'activité de l'axe HPA, mais probablement à une interaction avec les récepteurs aux opiacés présents à la surface des cellules.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence qu'une exposition chronique à la Bup n'affectait ni la production ni la biodisponibilité du Cort dans le plasma et n'avait pas d'impact sur les fonctions immunitaires. Ainsi, la Bup peut réduire la douleur sans toutefois causer les effets secondaires qui accompagnent généralement un traitement à la morphine. Bref, nos résultats indiquent clairement que la Bup peut être utilisée préférentiellement aux autres composés opiacés dans la traitement de la douleur chez des patients sévèrement traumatisés.

Par ailleurs, une brûlure sévère cause une élévation marquée de la concentration plasmatique en Cort suite à l'activation, par divers mécanismes, de l'axe HPA. Dans notre seconde étude, nous avons remarqué une induction rapide de la réponse associée au stress suite à l'observation d'une augmentation des niveaux de Cort total 24 heures suivant le traumatisme. Cette concentration élévée en Cort dans le plasma fut de courte durée, puisque le retour à des niveaux normaux de l'hormone furent mesurés dès le 5e jour suivant la brûlure. Associé à cette situation, nous observâmes une montée en flèche du pourcentage de Cort libre dont le maximum (16%) fut atteint 48 heures suivant le traumatisme. Ensuite, nous remarquâmes une décroissance et un retour à des valeurs normales (5-7 %) dès le 5e jour post-brûlure.

La variation du pourcentage de Cort libre fut le principal facteur qui servit à expliquer les fluctuations mesurées dans la quantité de Cort libre. En effet, nous avons observé une

augmentation de l'ordre de 400 à 500% des niveaux de l'hormone à l'état libre entre 24 et 48 heures post-brûlure et un retour à des valeurs normales dès le 5e jour. Un des facteurs qui expliqua cette situation fut la décroissance de l'expression du gène de la CBG dans le foie qui se produisit entre 12 et 24 heures suivant le traumatisme de la brûlure. En effet, il fut démontré qu'une concentration élévée en Cort plasmatique, comme celle observée lors d'une brûlure sévère, agissait d'une manière négative et transitive sur l'expression du gène de la CBG (Smith et Hammond, 1992). Deux hypothèses furent soulevées pour expliquer ce fait. Premièrement, bien qu'il n'existe aucun élément de réponse aux GC dans le gène murin de la CBG, nous croyons que le récepteur aux GC réprimerait la transcription du gène de la CBG via une interaction physique avec d'autres facteurs tel le HNF1 (hepatic nuclear factor 1). Aussi, quelques études ont rapporté un lien entre les niveaux élevés en IL-6, une cytokine pro-inflammatoire retrouvée en grande quantité dans le sérum de patients brûlés et la répression du gène de la CBG. Son action serait effectuée via une interaction directe avec un élément de réponse à l'IL-6 contenu dans le promoteur du gène de la CBG ou par une modification post-transcriptionnelle de l'ARNm codant pour la CBG, y affectant ainsi sa stabilité (Bartalena et al. 1993 ; Emptoz-Bonneton et al., 1997). Aussi, nous avons remarqué que la baisse de l'expression du gène de la CBG précédait la chûte de la concentration plasmatique du transporteur. Ceci entraîna à son tour une diminution de la capacité de liaison de la CBG dans le plasma. Un autre phénomène propre à la CBG peut influencer son efficacité à lier l'hormone. En effet, des études ont revélé que la CBG subissait un changement conformationnel durant l'inflammation (Pemberton et al, 1988). Cette modification de structure de la protéine serait causée par la présence d'élastase, une protéase relâchée en grande quantitée par les neutrophiles aux sites inflammatoires (Hammond et al., 1990). La CBG ainsi clivée, ne pourrait lier l'hormone. Tous ces phénomènes caractérisant le comportement du transporteur en réponse au traumatisme de la brûlure concordèrent remarquablement bien pour expliquer la hausse des niveaux de Cort libre mesurés à ce moment.

Après avoir caractérisé les changements qui expliquent la cinétique du Cort libre mesurée à la suite d'une brûlure sévère, nous avons voulu vérifier quel en serait l'impact sur le système immunitaire et plus spécifiquement sur le thymus. Les GC sont reconnus pour

être sécrétés en grande quantité dans des situations post-traumatiques et pour exercer une forte action sur le thymus. Nous avons observé une atrophie thymique, c'est-à-dire une perte de la masse cellulaire du thymus, entre 24 et 48 heures suivant une brûlure sévère. Cette diminution importante du nombre de cellules (50 %) fut principalement causée par la baisse du nombre de thymocytes doubles-positifs $CD4^+/CD8^+$. Cette sous-population lymphocytaire immature représente normalement 85% de tous les lymphocytes qui peuplent le thymus. Suite à la brûlure, le pourcentage de cellules doubles-positives ($CD4^+/CD8^+$) que nous avons mesuré ne réprésentait plus que 60 à 65% des lymphocytes totaux. L'atrophie du thymus fut passagère et réversible puisque dès le 5e jour post-brûlure et ce, jusqu'à la fin de notre étude, nous avons mesuré des valeurs normales pour toutes les sous-populations lymphocytaires. Aussi, nos résultats de phénotypage sont venus confirmer et préciser nos observations. Nous avons noté que la déplétion cellulaire du thymus était spécifiquement reliée à la diminution du nombre de cellules immatures affichant le marqueur de surface $CD24^+$. L'expression de ce marqueur de surface est une caractéristique propre aux cellules doubles-positives immatures ainsi qu'à une variété de sous-populations lymphocytaires de maturité faible à intermédiaire (Teh *et al.*, 1998). Par ailleurs, nous n'avons observé aucun changements causés par la brûlure sur les cellules matures du thymus, caractérisées par l'expression du marqueur de surface Qa.2.

Plusieurs raisons furent évoquées pour expliquer l'atrophie thymique que nous avons observé lors des deux premiers jours suivant une brûlure sévère. Les cellules doubles-positives du thymus sont reconnues pour être cortico-sensibles, c'est-à-dire qu'elles sont sujettes à la mort par apoptose lorsque misent en présence de GC. Un fait intéressant que nous avons remarqué aux jours 1 et 2 post-brûlure, était la relation qui existait entre la chute du nombre de thymocytes doubles-positifs et l'augmentation de la concentration en Cort libre, biologiquement actif. Or, ces sous-populations immatures du thymus évoluent dans une zone appelée cortex. Il fut démontré que la région corticale du thymus possédait les enzymes nécessaires pour convertir les précurseurs des hormones GC en Cort (Lechner *et al.*, 2001 ; Lechner *et al.*, 2000). Normalement, la sélection des cellules T qui s'effectue dans le thymus est le résultat des signaux positifs et négatifs que reçoit la cellule respectivement via le TcR et le récepteur aux GC. Cette évolution permet

d'assurer la mort des cellules auto-réactives reconnaissant les peptides du soi et l'établissement d'un répertoire de cellules T efficaces à reconnaître les antigènes (Ag) du non-soi. Une concentration en Cort élevée dans le thymus peut causer des défaillances dans la sélection des cellules T et précipiter la mort des thymocytes immatures. Des études ont révélé que l'apoptose des thymocytes induite par les GC se produisait via le signalement mitochondrial et impliquait la formation du complexe Apaf-1 et l'activation de la caspase-9. Il fut démontré que les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL exerçaient un rôle protecteur face à l'apoptose médiée par les GC. Fukuzuka et *al.* (2000a) observèrent que l'atrophie thymique découlant d'une brûlure sévère, s'accompagnait d'une augmentation des niveaux du Fas ligand et de l'activité apoptotique de la caspase-3. Il fut démontré qu'un pré-traitement des souris avec le mifepristone, un agent bloquant la liaison de l'hormone au récepteur des GC, inhibait ce phénomène.

En conclusion, nos résultats démontrent clairement que la CBG agit, lors d'une brûlure sévère, comme un important régulateur in vivo de l'action du Cort sur les cellules cortico-sensibles du thymus. Nous avons pu prouver que le stress causé par le traumatisme eût un impact négatif sur l'expression du gène de la CBG dans le foie. Cet événement précéda la diminution des niveaux de CBG circulant dans le sang et se solda par une réduction de la capacité de liaison du transporteur pour son hormone. Conjointement avec l'augmentation de la production de Cort via la stimulation de l'axe HPA, cette situation accentua les niveaux libres de l'hormone. Parallèlement, nous avons observer une forte corrélation entre la baisse du nombre de cellules cortico-sensibles et l'augmentation de la quantité de Cort biologiquement active.

Bibliographie

ADCOCK I.M., R. NEWTON ET P..J. BARNES. 1997. « NF-kappa B involvement in IL-1 beta-induction of GM-CSF and COX-2: inhibition by glucocorticoids does not require I-kappa B ». Biochemical Society Transactions. vol. 25, p. 154S

ADCOCK I.M. 2000. « Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions ». Pulmonary Pharmacology & Therapeutics. vol. 13, p. 115-126

ADCOCK I.M. 2001. « Glucocorticoid-regulated transcription factors ». Pulmonary Pharmacology & Therapeutics. vol. 14, p. 211-219.

AKHREM A.A., G.V. AVVAKUMOV, L.V. AKHREM, I.V. SIDOROVA ET O.A. STREL'CHYONOK. 1982. « Structural organization of the carbohydrate moiety of human transcortin as determined by methylation analysis of the whole glycoprotein ». Biochimica et Biophysica Acta. vol. 714, p. 177-180.

ALEXANDER J.W. 1990. « Mechanism of immunologic suppression in burn injury ». Journal of Trauma. vol. 30, p. S70-75.

ALLGOWER M., L.B. CUENI, K. STADTLER ET G.A. SCHOENENBERGER. 1973 « Burn toxin in mouse skin ». Journal of Trauma. vol. 13, p. 95-111.

ALMAWI W.Y. ET O.K. MELEMEDJIAN. 2002 « Negative regulation of nuclear factor-kappaB activation and function by glucocorticoids ». Journal of Molecular Endocrinology. vol. 28, p. 69-78.

ALMAWI W.Y., M.M. ABOU JAOUDE ET X.C. LI. 2002 « Transcriptional and post-transcriptional mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects ». Hematological Oncology. vol. 20, p. 17-32.

ANGELI A. « Circadian ACTH-adrenal rhythm in man ». 1974. Chronobiologia. vol. 1 p. 253-270.

ASADA A., Y. ZHAO, H. KOMANO, T. KUWATA, M. MUKAI, K. FUJITA, Y. TOZAWA, R. ISEKI, H. TIAN, K. SATO, Y. MOTEGI, R. SUZUKI, M. YOKOYAMA ET M. IWATA. 2000. « The calcium-independent protein kinase C participates in an early process of CD3/CD28-mediated induction of thymocyte apoptosis ». Immunology. vol. 101, p. 309-315.

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. 20-26.

AUPHAN N., J.A. DIDONATO, C. ROSETTE, A. HELMBERG ET M. KARIN. 1995. « Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis ». Science. 1995. vol. 270, p. 286-290.

AVVAKUMOV G.V., S. WARMELS-RODENHISER ET G.L. HAMMOND. 1993. « Glycosylation of human corticosteroid-binding globulin at aspargine 238 is necessary for steroid binding ». Journal of Biological Chemistry. vol. 268, p.862-866.

AVVAKUMOV G.V. ET G.L. HAMMOND. 1994a. « Substitutions of tryptophan residues in human corticosteroid-binding globulin:impact on steroid binding and glycosylation ». Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. vol. 49, p. 191-194.

AVVAKUMOV G.V. ET G.L. HAMMOND. 1994b. « Glycosylation of human corticosteroid-binding globulin. Differential processing and significance of carbohydrate chains at individual sites ». Biochemistry. vol. 33, p. 5759-5765.

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. 743-753.

BALLARD P.L. 1979. « Delivery and transport of glucocorticoids to target cells. Monographs on Endocrinology. vol. 12, p. 25-48.

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. 2435-2441.

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. 834-844.

BARLOW Y. 1994. « T lymphocytes and immunosuppression in the burned patient: a review. Burns. vol. 20, p. 487-490.

BARTALENA L., G.L. HAMMOND, A. FARSETTI, I.L. FLINK ET J. ROBBINS. 1993. « Interleukin-6 inhibits corticosteroid-binding globulin synthesis by human hepatoblastoma-derived (Hep G2) cells. » Endocrinology. vol. 133, p. 291-6.

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 Medecine. vol. 27, p. 1584-1591.

BERDUSCO E.T., K. YANG, G.L. HAMMOND ET J.R. CHALLIS. 1995. « Corticosteroid-binding globulin (CBG) production by hepatic and extra-hepatic sites in the ovine fetus; effects of CBG on glucocorticoid negative feedback on pituitary cells in vitro ». Journal of Endocrinology. vol. 146, p. 121-130.

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. 463-469.

BERNIER J., N. JOBIN, A. EMPTOZ-BONNETON, M.M. PUGEAT, ET D.R. GARREL. 1998. « Decreased corticosteroid-binding globulin in burn patients: relationship with interleukin-6 and fat in nutritional support ». Critical Care Medecine. vol. 26, p. 452-460.

BERRY C.C., T.L. WACHTEL ET H.A. FRANK. 1982. « An analysis of factors which predict mortality in hospitalized burn patients ». Burns, Including Thermal Injury. vol. 9, p. 38-45.

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 U S A. vol. 97, p. 9317-9322.

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.

BREWER J.A., B.P. SLECKMAN, W. SWAT ET L.J. MUGLIA. 2002a. « Green fluorescent protein-glucocorticoid receptor knockin mice reveal dynamic receptor modulation during thymocyte development ». Journal of Immunology. vol. 169, p. 1309-1318.

BREWER J.A., O. KANAGAWA, B.P. SLECKMAN ET L.J. MUGLIA. 2002b. « Thymocyte apoptosis induced by T cell activation is mediated by glucocorticoids in vivo ». Journal of Immunology. vol. 169, p. 1837-1843.

BRIEN T.G. 1988. « Pathophysiology of free cortisol in plasma ». Annals of the New York Academy of Sciences. vol. 538, p. 130-136

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 Respiratory Cell and Molecular Biology. vol. 19, p. 598-605.

BROWN S.M., B. STIMMEL, R.N. TAUB, S. KOCHWA ET R.E. ROSENFIELD. 1974. « Immunologic dysfunction in heroin addicts ». Archives of Internal Medecine. vol. 134, p. 1001-1006.

BRYANT H.U., E.W. BERNTON ET J.W. HOLADAY. 1988. « Morphine pellet-induced immunomodulation in mice: temporal relationships ». Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. vol. 245, p. 913-920.

BRYANT H.U., E.W. BERNTON, J.R. KENNER ET J.W. HOLADAY. 1991. « Role o adrenal cortical activation in the immunosuppressive effects of chronic morphine treatment ». Endocrinology. vol. 128, p. 3253-3258.

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. 1649-1658.

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. 1571-1574.

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.

CHRISTODOULOPOULOS 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. 479-484.

COLE T.J., H.J. HARRIS, I. HOONG, N. SOLOMON, R. SMITH, Z. KROZOWSKI ET M.J. FULLERTON. 1999. « The glucocorticoid receptor is essential for maintaining basal and dexamethasone-induced repression of the murine corticosteroid-binding globulin gene ». Molecular and Cellular Endocrinology. vol. 154, p. 29-36.

COSTELLO P.S., S.C. CLEVERLEY, R. GALANDRINI, S.W. HENNING ET D.A. CANTRELL. 2000. « The GTPase rho controls a p53-dependent survival checkpoint during thymopoiesis ». Journal of Experimental Medecine. vol. 192, p. 77-85.

COWAN, A., J.W. LEWIS ET I.R. MACFARLANE. 1977. « Agonist and antagonist properties of buprenorphine, a new antinociceptive agent ». British Journal of Pharmacology. vol.60, p. 537-545.

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. 803-806.

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. 211-220.

DE VERA M.E., B.S. TAYLOR, Q. WANG, R.A. SHAPIRO, T.R. BILLIAR ET D.A. GELLER. 1997. « Dexamethasone suppresses iNOS gene expression by upregulating I-kappa B alpha and inhibiting NF-kappa B ». American Journal of Physiology. vol. 273, p. G1290-1296.

DI ROSA M., M. RADOMSKI, R. CARNUCCIO ET S. MONCADA. 1990. « Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages ». Biochemical and Biophysical Research Communications. vol. 172, p. 1246-1252.

DORSHKIND K. ET N.D. HORSEMAN. 2001. « Anterior pituitary hormones, stress, and immune system homeostasis ». Bioessays. vol. 23, p. 288-294.

DUNN A.J. 2000. « Cytokine activation of the HPA axis ». Annals of the New York Academy of Sciences. vol. 917, p. 608-617

DUSWALD K.H., M. JOCHUM, W. SCHRAMM ET H. FRITZ. 1985. « Released granulocytic elastase: an indicator of pathobiochemical alterations in septicemia after abdominal surgery ». Surgery. vol. 98, p. 892-899.

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.

EL FAHIME E., B. LUTZ-BUCHER, J.M. FELIX ET B. KOCH. 1996. « Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces expression of corticosteroid-binding globulin in cultured fetal hepatocytes: synergy with tri-iodothyronine ». Biochemical Journal. vol. 315, p. 643-649.

EL FAHIME E.L., J.M. FELIX ET B. KOCH. 1994. « Antagonistic effects of retinoic acid and triiodothyronine in the expression of corticoid-binding globulin (CBG) by cultured fetal hepatocytes ». Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. vol. 48, p. 467-474.

EMPTOZ-BONNETON A., P. COUSIN, K. SEGUCHI, G.V. AVVAKUMOV, C. BULLY, G.L. HAMMOND ET M. PUGEAT. 2000. « Novel human corticosteroid-binding globulin variant with low cortisol-binding affinity ». Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. vol. 85, p. 361-367.

EMPTOZ-BONNETON A., J.C. CRAVE, H. LEJEUNE, C. BREBANT, 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. 3758-3762.

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. 524-531.

FAICT D., G. VERHOEVEN, B. MERTENS ET P. DE MOOR. 1985. « Transcortin and alpha 2u-globulin messenger RNA activities during turpentine-induced inflammation in the rat. Journal of Steroid Biochemistry. vol. 23, p. 243-246.

FAICT D., G. VANDOREN, P. DE MOOR, E. LESAFFRE ET G. VERHOEVEN. 1983. « Response of transcortin and alpha 2u-globulin to turpentine-induced inflammation in the rat: influence of corticosteroids and prolactin ». Journal of Endocrinology. vol. 99, p. 465-468.

FLORES L.R., S.M. WAHL ET B.M. BAYER. 1995. « Mechanisms of morphine-induced immunosuppression: effect of acute morphine administration on lymphocyte trafficking ». Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics. vol. 272, p. 1246-1251.

FREIER D.O. ET B.A. FUCHS. 1994. « A mechanism of action for morphine-induced immunosuppression: corticosterone mediates morphine-induced suppression of natural killer cell activity ». Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. vol. 270, p. 1127-1133.

FUKUZUKA K., C.K. EDWARDS, M. CLARE-SALZLER, E.M. COPELAND, L.L. MOLDAWER ET D.W. MOZINGO. 2000a. « Glucocorticoid-induced, caspase-dependent organ apoptosis early after burn injury ». American Journal of Physiology Regulatory InteGRative Complements Physiology. vol. 278, p. 1005-1018

FUKUZUKA K., C.K. EDWARDS 3RD, M. CLARE-SALZER, E.M. COPELAND 3RD, L.L. MOLDAWER ET D.W. MOZINGO. 2000b. « Glucocorticoid and Fas ligand induced mucosal lymphocyte apoptosis after burn injury ». Journal of Trauma. vol. 49, p. 710-716.

GARREL D.R. 1996. « Corticosteroid-binding globulin during inflammation and burn injury: nutritional modulation and clinical implications. Hormone Research. vol. 45, p. 245-251.

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

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. 336-342.

GOMEZ-FLORES R. ET R.J. WEBER. 1999. « Inhibition of interleukin-2 production and downregulation of IL-2 and transferrin receptors on rat splenic lymphocytes following PAG morphine administration: a role in natural killer and T cell suppression ». Journal of Interferon and Cytokine Research. vol. 19, p. 625-630.

GOMEZ-FLORES, R. ET R.J. WEBER. 2000. « Differential effects of buprenorphine and morphine on immune and neuroendocrine functions following acute administration in the rat mesencephalon periaqueductal GRay ». Immunopharmacology. vol. 48, p. 145-156.

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, p. S158-S165.

GRUNFELD J.P. 1990. « Glucocorticoids in blood pressure regulation ». Hormone Research. vol. 34, p. 111-113.

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 Medecine. vol. 159, p. 1600-1604.

HAMMOND G.L., C.L. SMITH ET D.A. UNDERHILL. 1991. « Molecular studies of corticosteroid binding globulin structure, biosynthesis and function ». Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. vol. 40, p. 755-762.

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. 34-39.

HAMMOND G.L., C.L. SMITH, I.S. GOPING, D.A. UNDERHILL, M.J. HARLEY, J. REVENTOS, N.A. MUSTO, G.L. GUNSALUS ET C.W. BARDIN. 1987. « Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serine protease inhibitors ». Proceedings of the National Academy of Sciences U S A. vol. 84, p. 5153-5157.

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. 1295-1304.

HASSELGREN P.O. 2000 « Catabolic response to stress and injury: implications for regulation ». World Journal of Surgery. vol. 24, p. 1452-1459.

HENCH P.S., E.C. KENDALL, C.H. SLOCUMB ET H.F. POLLEY. 1949. « The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone : compound E) and of the pituitary adrenocorticotropic hormone on rheumatoid arthritis. Proceedings of the Mayo Clinic. vol. 24, p. 181-197.

HEYNS W. ET J.L. COOLENS. 1988. « Physiology of corticosteroid-binding globulin in humans ». Annals of the New York Academy of Sciences. vol. 538, p. 122-9.

HSU B.R. ET R.W KUHN. 1988. « The role of the adrenal in generating the diurnal variation in circulating levels of corticosteroid-binding globulin in the rat ». Endocrinology. vol. 122, p. 421-426.

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 U S A. vol. 85, p. 7699-7703.

ITO K. P.J. BARNES ET I.M. ADCOCK IM. 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. 6891-6903.

JACOBS R.A., V.K. HAN, G.L. HAMMOND ET J.R. CHALLIS. 1991. « Effect of adrenocorticotropin administration on the biosynthesis of corticosteroid-binding globulin in fetal sheep ». Endocrinology. vol. 128, p. 1960-1966.

JANEWAY C.A. ET P. TRAVERS. 1997. Immunobiologie. Bruxelles : De Boek.

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. 5781-5785.

JOBIN N., D.R. GARREL ET J. BERNIER. 2000. « Increased burn-induced immunosuppression in lipopolysaccharide-resistant mice ». Cellular Immunology. vol. 200, p. 65-75.

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. 337-340.

JOYCE D.A., J.H. STEER ET L.J. ABRAHAM. 1997. « Glucocorticoid modulation of human monocyte/macrophage function: control of TNF-alpha secretion ». Inflammation Research. vol. 46, p. 447-451.

KAMEI, J., M. SODEYAMA, M. TSUDA, T. SUZUKI ET H. NAGASE. 1997. « Antinociceptive effect of buprenorphine in mu1-opioid receptor deficient CXBK mice». Life Science. vol. 60, p. 333-337.

KANELAKIS K.C., D.S. SHEWACH ET W.B. PRATT. 2002. « Nucleotide binding states of HSP70 and HSP90 during sequential steps in the process of glucocorticoid receptor.HSP90 heterocomplex assembly ». Journal of Biological Chemistry. vol. 277, p. 33698-33703.

KATO E.A., B.R. HSU ET R.W. KUHN. 1988 « Comparative structural analyses of corticosteroid binding globulin ». Journal of Steroid Biochemistry. vol. 29, p. 213-220.

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. 647-656.

KOBAYASHI K, T. YAMAMOTO, K. CHIBA, M. TANI, N. SHIMADA, T. ISHIZAKI ET Y. KUROIWA. 1998. « Human buprenorphine N-dealkylation is catalyzed by cytochrome P450 3A4 ». Drug Metabolism and Disposition. vol. 26, p. 818-821.

KOHLER M., H. HALLER ET E. HARTMANN. 1999. « Nuclear protein transport pathways ». Experimental Nephrology. vol. 7, p. 290-294

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. 469-473.

KOVALOVSKY D., D. REFOJO, F. HOLSBOER ET E. ARZT. 2000. « Molecular mechanisms and Th1/Th2 pathways in corticosteroid regulation of cytokine production ». Journal of Neuroimmunology. vol. 109, p. 23-29.

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. 2075-2085.

KRETZ O., H.M. REICHARDT, G. SCHUTZ ET R. BOCK. 1999. « Corticotropin-releasing hormone expression is the major target for glucocorticoid feedback-control at the hypothalamic level ». Brain Research. vol. 818, p. 488-491.

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. 769-776.

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. 337-346.

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. 5653-5659.

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 Medecine. vol. 186, p.1567-1574.

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. 21467-21472.

LILL-ELGHANIAN D., K. SCHWARTZ, L. KING ET P. FRAKER. 2002. « Glucocorticoid-induced apoptosis in early B cells from human bone marrow ». Experimental Biology and Medecine. vol. 227, p. 763-770.

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. 3796-3801.

LOHRER P., J. GLODDEK, A.C. NAGASHIMA, Z. KORALI, U. HOPFNER, M.P. PEREDA, E. ARZT, G.K. STALLA 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. 4457-4465.

LU Z.W., W.J. DAI, G.L. WANG ET Z.B. LIN. 1996. « Subchronic in vivo treatments of morphine inhibit T-cell proliferation by acting on macrophages ». Brain Behavioral Immunology. vol. 10, p. 351-363.

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. 191-195.

MARIDONNEAU-PARINI I., M. ERRASFA ET F. RUSSO-MARIE. 1989. « Inhibition of O2- generation by dexamethasone is mimicked by lipocortin I in alveolar macrophages ». Journal of Clinical Investigation. vol. 83, p. 1936-1940.

MARTI O., M. MARTIN, A. GAVALDA, M. GIRALT, J. HIDALGO, B.R. HSU, R.W. KUHN, ET A. ARMARIO. 1997. « Inhibition of corticosteroid-binding globulin caused

by a severe stressor is apparently mediated by the adrenal but not by glucocorticoid receptors ». Endocrine. vol. 6, p. 159-164.

MARTIN, W.R., C.G. EADES, J.A. THOMPSON, R.E. HUPPLER ET P.E. GILBERT. 1976. « The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog ». Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. vol. 197, p. 517-532.

MARTIN M.E., C. BENASSAYAG ET E.A. NUNEZ. 1988. « Selective changes in binding and immunological properties of human corticosteroid binding globulin by free fatty acids ». Endocrinology. vol. 123, p. 1178-1186.

MASFERRER J.L., S.T. REDDY, B.S. ZWEIFEL, K. SEIBERT, P. NEEDLEMAN, R.S. GILBERT ET H.R. HERSCHMAN. 1994 « In vivo glucocorticoids regulate cyclooxygenase-2 but not cyclooxygenase-1 in peritoneal macrophages ». Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. vol. 270, p. 1340-1344.

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 U S A. vol. 89, p. 3917-3921.

MATERA L., G. BELLONE, J.J. LEBREN, P.A. KELLY, E.L. HOOGHE PETERS, P.F. DI CELLE, R. FOA, M. CONTARINI, G. AVANZI ET V. ASNAGHI. 1996. « Role of prolactin in the in vitro development of interleukin-2-driven anti-tumoural lymphokine-activated killer cells ». Immunology. vol. 89, p. 619-626.

MATSUI M., T. KUDO, M. KUDO, H. ISHIHARA ET A. MATSUKI. 1991. « The endocrine response after burns ». Agressologie. vol. 32 p. 233-235.

MATSUKI Y., H.G. ZHANG, H.C. HSU, P.A. YANG, T. ZHOU, C.H. DODD, F. CECCONI, P. GRUSS, T. TADAKUMA ET J.D. MOUNTZ. 2002. « Different role of Apaf-1 in positive selection, negative selection and death by neglect in foetal thymic organ culture ». Scandinavian Journal of Immunology. vol. 56, p. 174-184.

MCCANN S.M., M . KIMURA, S. KARANTH, W.H. YU, C.A. MASTRONARDI ET V. RETTORI. 2000. « The mechanism of action of cytokines to control the release of hypothalamic and pituitary hormones in infection ». Annals of the New York Academy of Sciences. vol. 917, p. 4-18.

MCDONOUGH R.J., J.J. MADDEN, A. FALEK, D.A. SHAFER, M. PLINE , D. GORDON, P. BOKOS, J.C. KUEHNLE ET J. MENDELSON. 1980. « Alteration of T and null lymphocyte frequencies in the peripheral blood of human opiate addicts: in vivo evidence for opiate receptor sites on T lymphocytes ». Journal of Immunology. vol. 125, p. 2539-2543.

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. 435-459.

MCKEAN D.J., C.J. HUNTOON, M.P. BELL, X. TAI, S. SHARROW, K.E. HEDIN, A. CONLEY ET A. SINGER. 2001. « Maturation versus death of developing double-positive thymocytes reflects competing effects on Bcl-2 expression and can be regulated by the intensity of CD28 costimulation ». Journal of Immunology. vol. 166, p. 3468-3475.

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. 919-927.

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.

MISAO R., S. IWAGAKI, W.S. SUN, J. FUJIMOTO, M. SAIO, T. TAKAMI ET T. TAMAYA. 1999. « Evidence for the synthesis of corticosteroid-binding globulin in human placenta ». Hormone Research. vol. 51, p. 162-167.

MISAO R., Y. NAKANISHI, J. FUJIMOTO ET T. TAMAYA. 1998. « Effects of sex steroid hormones on corticosteroid-binding globulin gene expression in human endometrial cancer cell line Ishikawa ». Annals Clinical Biochemistry. vol. 35, p. 637-642.

MITTELSTADT P.R. ET J.D. ASHWELL. 2001 « Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. Journal of Biological Chemistry. vol. 276, p. 29603-29610.

MIYAURA H. ET M. IWATA. 2000. « Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids ». Journal of Immunology. vol. 168, p. 1087-1094.

MOORE R.A., R.F. SMITH, H.J. MCQUAY ET R.E. BULLINGHAM. 1981. « Sex and surgical stress ». Anaesthesia. vol. 36, p. 263-267.

MORISHIMA Y., K.C. KANELAKIS, A.M. SILVERSTEIN, K.D. DITTMAR, L. ESTRADA ET W.B. PRATT. 2000. « The HSP organizer protein hop enhances the rate of but is not essential for glucocorticoid receptor folding by the multiprotein HSP90-based chaperone system ». Journal of Biological Chemistry. vol. 275, p. 6894-6900.

MORNEX J.F., A. CHYTIL-WEIR, Y. MARTIN ET, M. COURTNEY, J.P. LECOCQ ET R.G. CRYSTAL. 1986. « Expression of the alpha-1-antitrypsin gene in mononuclear

phagocytes of normal and alpha-1-antitrypsin-deficient individuals ». Journal of Clinical Investigations. vol. 77, p. 1952-1961.

MURATA Y., K. SUEDA, H. SEO ET N. MATSUI. 1989. « Studies on the role of glycosylation for human corticosteroid-binding globulin: comparison with that for thyroxine-binding globulin ». Endocrinology. 125, p. 1424-1429.

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. 388-392.

NOCK B, M. WICH, T.J. CICERO ET L.H. O'CONNOR. 2000. « Testosterone is required for corticosteroid-binding globulin upregulation by morphine to be fully manifested ». Pharmacology, Biochemistry and Behavior. vol. 67, p. 193-198.

NOCK B., T.J. CICERO ET M. WICH. 1998. « Chronic exposure to morphine decreases physiologically active corticosterone in both male and female rats but by different mechanisms ». Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. vol. 286, p. 875-882.

NOCK B., M. WICH ET T.J. CICERO. 1997. « Chronic exposure to morphine increases corticosteroid-binding globulin ». Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 1997 vol. 282, p. 1262-1268.

NOCKHER W.A. ET J.E. SCHERBERICH. 1997 « Expression and release of the monocyte lipopolysaccharide receptor antigen CD14 are suppressed by glucocorticoids in vivo and in vitro ». Journal of Immunology. vol. 158, p. 1345-1352.

NORMENT A.M., L.Y. BOGATZKI, B.N. GANTNER ET M.J. BEVAN. 2000. « Murine CCR9, a chemokine receptor for thymus-expressed chemokine that is up-regulated following pre-TCR signaling ». Journal of Immunology. vol. 164, p. 639-648.

NYBERG L., L.N. MAREKOV, I. JONES, G. LUNDQUIST ET H. JORNVALL. 1990. « Characterization of the murine corticosteroid binding globulin: variations between mammalian forms ». Journal of Steroid Biochemistry. vol. 35, p. 61-65.

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. 9550-9559.

ORAVA M., X.F. ZHAO, E. LEITER ET G.L. HAMMOND. 1994. « Structure and chromosomal location of the gene encoding mouse corticosteroid-binding globulin: strain differences in coding sequence and steroid-binding activity ». Gene. vol. 144, p. 259-264.

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. 508-510.

PATSCHAN D., K. LODDENKEMPER ET F. BUTTGEREIT. 2001 « Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis ». Bone. vol. 29, p. 498-505.

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. 727-729.

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.

PECHNICK R.N., R. GEORGE ET R.E. POLAND. 1985. « The effects of the acute administration of buprenorphine hydrochloride on the release of anterior pituitary hormones in the rat: evidence for the involvement of multiple opiate receptors ». Life Science. vol. 37, p. 1861-1868.

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. 257-258.

PENDE A., N.R. MUSSO, M.L. MONTALDI, G. PASTORINO, M. ARZESE ET L. DEVILLA. 1986. « Evaluation of the effects induced by four opiate drugs, with different affinities to opioid receptor subtypes, on anterior pituitary LH, TSH, PRL and GH secretion and on cortisol secretion in normal men ». Biomedicine and Pharmacotherapy. vol. 40, p. 178-182.

PÉNIT C ET F. VASSEUR. 1997. « Expansion of mature thymocyte subsets before emigration to the periphery ». Journal of Immunology. vol. 159, p. 4848-4856.

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. 3521-3529.

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. 946-952.

PETERSON P.K., B. SHARP, G. GEKKER, C. BRUMMITT ET W.F. KEANE. 1987 B. « Opioid-mediated suppression of interferon-gamma production by cultured peripheral blood mononuclear cells ». Journal of Clinical Investigation. vol. 80, p. 824-831.

PETERSON P.K., B. SHARP, G. GEKKER, C. BRUMMITT ET W.F. KEANE. 1987 A. « Opioid-mediated suppression of cultured peripheral blood mononuclear cell respiratory burst activity ». Journal of Immunology. vol. 138, p. 3907-3912.

PLANEY S.L. ET G. LITWACK. 2000. « Glucocorticoid-induced apoptosis in lymphocytes ». Biochemical Biophysical Research Communications. vol. 279, p. 307-312

POWELL L.M. ET R.H. PAIN. 1992. « Effects of glycosylation on the folding and stability of human, recombinant and cleaved alpha 1-antitrypsin ». Journal of Molecular Biology. vol. 224, p. 241-252.

PUGEAT M., A. BONNETON, 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. 1675-1679.

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. 179-186.

RADOMSKI M.W., R.M. PALMER ET S. MONCADA. 1990. « Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A. vol. 87, p. 10043-10047.

RAJAPANDI T., L.E. GREENE ET E. EISENBERG. 2000. « The molecular chaperones HSP90 and Hsc70 are both necessary and sufficient to activate hormone binding by glucocorticoid receptor ». Journal of Biological Chemistry. vol. 275, p. 22597-22604.

REFOJO D., A.C. LIBERMAN, F. HOLSBOER ET E. ARZT. 2001. « Transcription factor-mediated molecular mechanisms involved in the functional cross-talk between cytokines and glucocorticoids ». Immunology and Cell Biology. vol. 79, p. 385-394.

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. 2344-2354.

RISTIMAKI A., K. NARKO ET T. HLA. 1996 « Down-regulation of cytokine-induced cyclo-oxygenase-2 transcript isoforms by dexamethasone: evidence for post-transcriptional regulation ». Biochemistry Journal. vol. 318, p. 325-331.

ROBYR D., A.P. WOLFFE ET W. WAHLI. 2000. « Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks ». Molecular Endocrinology. vol.14, p. 329-347.

ROJAVIN M., I. SZABO, J.L. BUSSIERE, T.J. ROGERS, M.W. ADLER ET T.K. EISENSTEIN. 1993. « Morphine treatment in vitro or in vivo decreases phagocytic functions of murine macrophages ». Life Science. vol. 53, p. 997-1006.

ROLANDI E., A. MARABINI, R. FRANCESCHINI, V. MESSINA, P. BONGERA ET T. BARRECA. 1983. « Changes in pituitary secretion induced by an agonist-antagonist opioid drug, buprenorphine ». Acta Endocrinologica (Copenh). vol. 104, p. 257-260.

ROLLINI P. ET R.E. FOURNIER. 1999. « The HNF-4/HNF-1alpha transactivation cascade regulates gene activity and chromatin structure of the human serine protease inhibitor gene cluster at 14q32.1 ». Proceedings of the National Academy of Sciences U S A. vol. 96, p. 10308-10313.

ROSNER W. 1991. « Plasma steroid-binding proteins ». Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. vol. 20, p. 697-720.

ROSNER W., D.J. HRYB, M.S. KHAN, C.J. SINGER ET A.M. NAKHLA. 1988. « Are corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin hormones? » Annals of the New York Academy of Sciences. vol. 538, p. 137-145.

ROY S., S. RAMAKRISHNAN, H.H. LOH ET N.M. LEE. 1991. « Chronic morphine treatment selectively suppresses macrophage colony formation in bone marrow ». European Journal of Pharmacology. vol. 195, p. 359-363.

RYAN C.M., M.L. YARMUSH, J.F. BURKE ET R.G. TOMPKINS. 1992. « Increased gut permeability early after burns correlates with the extent of burn injury ». Critical Care Medecine. vol. 20, p. 1508-1512.

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.

SAVU L., H. ZOUAGHI, A. CARLI ET E.A. NUNEZ. 1981. « Serum depletion of corticosteroid binding activities, an early marker of human septic shock ». Biochemical Biophysical Research Communications. vol. 102, p. 411-419.

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. 33-35.

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. 1344-1351.

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 Biophysica Acta. vol. 1455, p. 45-53.

SCOTT M. ET D.J. CARR. 1996. « Morphine suppresses the alloantigen-driven CTL response in a dose-dependent and naltrexone reversible manner ». Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. vol. 278, p. 980-988.

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. 1371-1376.

SELCER K.W. ET W.W. LEAVITT. 1988. « Hamster uterine tissues accumulate corticosteroid-binding globulin during decidualization ». Biology of Reproduction. vol. 39, p. 592-602.

SELYE, J. 1936. « Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxications ». British journal of experimental pathology. vol. 17, p. 234-238.

SERALINI G.E., C.M. UNDERHILL, C.L. SMITH, V.T. NGUYEN ET G.L. HAMMOND. 1989. « Biological half-life and transfer of maternal corticosteroid-binding globulin to amniotic fluid in the rabbit ». Endocrinology. vol. 125, p. 1321-1325.

SERALINI G.E. 1996. « Regulation factors of corticosteroid-binding globulin: lesson from ontogenesis ». Hormone Research. vol. 45, p. 192-196.

SEVALJEVIC L., S. IVANOVIC-MATIC, M. PETROVIC, M. GLIBETIC, D. PANTELIC ET G. POZNANOVIC. 1989. « Regulation of plasma acute-phase protein and albumin levels in the liver of scalded rats ». Biochemistry Journal. vol. 258, p. 663-668.

SHEPPARD K.A., K.M. PHELPS, A.J. WILLIAMS, D. THANOS, C.K. GLASS, M.G. ROSENFELD, M.E. GERRITSEN ET T. COLLINS. 1998. « Nuclear inteGRation of glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1 ». Journal of Biological Chemistry. vol. 273, p. 29291-29294.

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. 822-825.

SHIPSTON M.J. ET F.A. ANTONI. 1992. « Inactivation of early glucocorticoid feedback by corticotropin-releasing factor in vitro ». Endocrinology. vol. 130, p. 2213-2218.

SINGER M. ET P. BERG. 1992. Genes & Genomes. Mill Valley: University Science Books. chapitre 3, p. 192-195.

SMITH C.L. ET G.L. HAMMOND. 1992. « Hormonal regulation of corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the male rat ». Endocrinology. vol. 130, p. 2245-2251.

SMITH A., C. BARCLAY, A. QUABA, K. SEDOWOFIA, R. STEPHEN, M. THOMPSON, A. WATSON ET N. MCINTOSH. 1997. « The bigger the burn, the greater the stress ». Burns. vol. 23, p. 291-294.

SPARKES B.G. 1997 « Immunological responses to thermal injury ». Burns. vol. 23, p. 106-113.

STRELCHYONOK O.A. ET AVVAKUMOV G.V. 1990. « Specific steroid-binding glycoproteins of human blood plasma: novel data on their structure and function ». Journal of Steroid Biochemistry. vol. 35, p. 519-534.

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 Medecine. vol. 193, p. 585-594.

STROUPE S.D., R.D. GRAY ET U. WESTPHAL. 1978. « Steroid-protein interactions. Kinetics of binding of cortisol and progesterone to human corticosteroid-binding globulin ». FEBS Letters. vol. 86, p. 61-64.

SUZUKI G., H. SAWA, Y. KOBAYASHI, Y. NAKATA, K. NAKAGAWA, A. UZAWA, H. SAKIYAMA, S. KAKINUMA, K. IWABUCHI ET K. NAGASHIMA. 1999. « Pertussis toxin-sensitive signal controls the trafficking of thymocytes across the corticomedullary junction in the thymus ». Journal of Immunology. vol. 162, p. 5981-5985.

TANNENBAUM B., W. ROWE, S. SHARMA, J. DIORIO, A. STEVERMAN, M. WALKER ET M.J. MEANEY. 1997. « Dynamic variations in plasma corticosteroid-binding globulin and basal HPA activity following acute stress in adult rats ». Journal of Neuroendocrinoly. vol. 9, p. 163-168.

TEH H.S., B. MOTYKA ET S.J. TEH. 1998. « Positive selection of thymocytes expressing the same TCR by different MHC ligands results in the production of functionally distinct thymocytes distinguished by differential expression of the heat stable antigen ». Journal of Immunology. vol. 160, p. 718-727.

TEODORCZYK-INJEYAN 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.318-328.

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. 13531-13536.

TIAN T., J. ZHANG, L. GAO, X.P. QIAN ET W.F. CHEN. 2001. « Heterogeneity within medullary-type TCRalphabeta(+)CD3(+)CD4(-)CD8(+) thymocytes in normal mouse thymus ». International Immunology. vol. 13, p. 313-320.

TORPY D.J., A.W. BACHMANN, J.E. GRICE, S.P. FITZGERALD, P.J. PHILLIPS, J.A. WHITWORTH ET R.V. JACKSON. 2001. « Familial corticosteroid-binding globulin deficiency due to a novel null mutation: association with fatigue and relative hypotension ». Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. vol. 86, p. 3692-3700.

TREDGET E.E. ET Y.M. YU. 1992 « The metabolic effects of thermal injury ». World Journal of Surgery. vol. 16, p. 68-79.

TSAI Y.C., S.J. WON ET M.T. LIN. 2000. « Effects of morphine on immune response in rats with sciatic constriction injury ». Pain. vol. 88, p. 155-160.

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.

UNDERHILL D.A. ET G.L. HAMMOND. 1995. « cis-regulatory elements within the proximal promoter of the rat gene encoding corticosteroid-binding globulin » . Gene. 1995, vol. 162, p. 205-211.

VACCHIO M.S. ET J.D. ASHWELL. 2000. « Glucocorticoids and thymocyte development ». Seminars in Immunology. vol. 12, p. 475-485.

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. 1327-1333.

VACCHIO M.S. ET J.D. ASHWELL. 1997. « Thymus-derived glucocorticoids regulate antigen-specific positive selection ». Journal of Experimental Medecine. vol. 185, p. 2033-2038.

VACCHIO M.S., V. PAPADOPOULOS ET J.D. ASHWELL. 1994. « Steroid production in the thymus: implications for thymocyte selection ». Journal of Experimental Medecine. vol. 179, p. 1835-1846.

VAN BAELEN H., S.G. POWER ET G.L. HAMMOND. 1993. « Decreased cortisol-binding affinity of transcortin Leuven is associated with an amino acid substitution at residue-93 ». Steroids. vol. 58, p. 275-277.

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 Medecine. vol. 193, p. 803-814.

VAN LOVEREN H., N. GIANOTTEN, C.F. HENDRIKSEN, H.J. SCHUURMAN ET J.W. VAN DER LAAN. !994. « Assessment of immunotoxicity of buprenorphine ». Laboratory Animals. vol. 28, p. 355-363.

VAN WETERING S., S.P. MANNESSE-LAZEROMS, M.A. VAN STERKENBURG ET P.S. HIEMSTRA. 2002. « Neutrophil defensins stimulate the release of cytokines by airway epithelial cells: modulation by dexamethasone ». Inflammation Research. vol. 51, p. 8-15.

VAUGHAN G.M., R.A. BECKER, J.P. ALLEN, C.W. JR GOODWIN, B.A. JR PRUITT BA ET A.D. JR MASON. 1982. « Cortisol and corticotrophin in burned patients ». Journal of Trauma. vol. 22, p. 263-273.

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. 232-240.

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. 11-19.

WANG J., R. CHARBONEAU, S. BALASUBRAMANIAN, R.A. BARKE, H.H. LOH ET S. ROY. 2002. « The immunosuppressive effects of chronic morphine treatment are partially dependent on corticosterone and mediated by the mu-opioid receptor ». Journal of Leukocyte Biology. vol. 71, p. 782-790.

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 U S A. vol. 98, p. 6865-6870.

WELTERS I.D., A. MENZEBACH, Y. GOUMON, T.W. LANGEFELD, H. TESCHEMACHER, G. HEMPELMANN ET G.B. STEFANO. 2000a. « Morphine suppresses complement receptor expression, phagocytosis, and respiratory burst in neutrophils by a nitric oxide and mu(3) opiate receptor-dependent mechanism ». Journal of Neuroimmunology. vol. 111, p. 139-145.

WELTERS I.D., A. MENZEBACH, Y. GOUMON, P. CADET, T. MENGES, T.K. HUGHES, G. HEMPELMANN ET G.B. STEFANO. 2000b. « Morphine inhibits NF-

kappaB nuclear binding in human neutrophils and monocytes by a nitric oxide-dependent mechanism ». Anesthesiology. vol. 92, p. 1677-1684.

WEST J.P., L.A. DYKSTRA ET D.T. LYSLE. 1998. « Differential tolerance to morphine's immunomodulatory effects following continuous administration ». Drug and Alcohol Dependance. vol. 53, p. 31-38.

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. 3873-3881.

WILSON J.D., D.W. FOSTER, H.M. KRONENBERG ET P.R. LARSEN. 1998. Williams Textbook of Endocrinology, 9th edition. Philadelphie: W.B. Saunders Company.

WILSON A., L.M. DAY, R. SCOLLAY ET K. SHORTMAN. 1988. « Subpopulations of mature murine thymocytes: properties of CD4-CD8+ and CD4+CD8- thymocytes lacking the heat-stable antigen ». Cellular Immunology. vol. 117, p. 312-326.

WOLFE R.R., F. JAHOOR ET W.H. HARTL. 1989. « Protein and amino acid metabolism after injury ». Diabetes Metabolism Reviews. vol. 5, p. 149-164

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. 870-877.

WYSOCKA M., M. KUBIN, L.Q. VIEIRA, L. OZMEN, G. GAROTTA, P. SCOTT ET G. TRINCHIERI. 1995. « Interleukin-12 is required for interferon-gamma production and lethality in lipopolysaccharide-induced shock in mice ». European Journal of Immunology. vol. 25, p. 672-676.

ZHANG J., K. MIKECZ, A. FINNEGAN ET T.T. GLANT. 2000. « Spontaneous thymocyte apoptosis is regulated by a mitochondrion-mediated signaling pathway ». Journal of Immunology. vol. 165, p. 2970-2974.

ZHAO X.F., D.A. UNDERHILL ET G.L. HAMMOND. 1997. « Hepatic nuclear proteins that bind cis-regulatory elements in the proximal promoter of the rat corticosteroid-binding globulin gene ». Molecular and Cellular Endocrinology. vol. 126, p. 203-212.

ZUBELEWICZ B., R. BRACZKOWSKI, D. RENSHAW ET M.S. HARBUZ. 1999. « Central injection of morphine stimulates plasma corticosterone and interleukin (IL)-6 and IL-6 R mRNAs in the pituitary and adrenals in adjuvant-induced arthritis ». Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents. vol. 13, p. 103-109.