

Université du Québec
INRS-Institut Armand Frappier
Campus Pointe-Claire

**Les brûlures sévères modifient l'homéostasie des lymphocytes T en altérant
l'activation des cellules T naïves**

Par
Julie Patenaude

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

Dr. Alain Fournier
INRS-Institut Armand Frappier

Examineur externe

Dr. Michel Tremblay
CHUL, Québec

Directeur de recherche

Dr. Jacques Bernier
INRS-Institut Armand Frappier

© *Droits réservés de Julie Patenaude, 2002*

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	III
LISTE DES ABRÉVIATIONS	IV
LISTE DES FIGURES	VI
SOMMAIRE	VII
INTRODUCTION	1
 SECTION 1 : REVUE DE LITTÉRATURE.....	3
CHAPITRE 1 : LYMPHOCYTES T	4
1.1 INTRODUCTION : SYSTÈME IMMUNITAIRE	4
1.1.1 IMMUNITÉ INNÉE	4
1.1.2 IMMUNITÉ ACQUISE	8
1.2 LES LYMPHOCYTES T	9
1.2.1 ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T	9
1.2.2 RÔLE DES MOLÉCULES DE CO-STIMULATION	12
1.2.3 LYMPHOCYTES T AUXILIAIRES (T _H)	13
1.2.3.1 SOUS-POPULATIONS DES LYMPHOCYTES T AUXILIAIRES	17
1.2.4 LYMPHOCYTES T CYTOTOXIQUES (T _C).....	19
1.2.5 HOMÉOSTASIE DES LYMPHOCYTES T.....	20
CHAPITRE 2 : APOPTOSE ET ANERGIE DES LYMPHOCYTES T	22
2.1 RÔLE DE L'APOPTOSE	22
2.2 CASPASES : PROTÉASES EXÉCUTRICES DE L'APOTPOSE	24
2.2.1 ACTIVATION DES CASPASES.....	25
2.2.1.1 VOIE DE LA MITOCHONDRIE.....	26
2.2.1.2 VOIE DES RÉCEPTEURS DE MORT	26
2.2.2 RÉGULATION DE L'APOPTOSE.....	27
2.3 ANERGIE	29
2.3.1 CAUSES PRINCIPALES D'ANERGIE CHEZ LES LYMPHOCYTES T.....	30
CHAPITRE 3 : BRÛLURES SÉVÈRES ET LE SYSTÈME IMMUNITAIRE	34
3.1 EFFETS D'UNE BRÛLURE SÉVÈRE	34
3.1.1 ALTÉRATION DE DIVERS SYTÈMES	34
3.1.2 ALTÉRATION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE	36
3.2.1.1 ALTÉRATION DE LA RÉPONSE NON-SPÉCIFIQUE	37
3.2.1.2 ALTÉRATION DE LA RÉPONSE SPÉCIFIQUE	43
3.3 BRÛLURE SÉVÈRE – LYMPHOCYTES T.....	43
3.3.1 PROLIFÉRATION ET ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T POST-TRAUMA	46
3.3.2 POLARISATION DES CYTOKINES DE TYPE TH1 VERSUS TH2	50

3.4 RÔLE DE L'APOPTOSE POST-TRAUMA.....	51
3.4.1 VOIES D'ACTIVATION DE L'APOPTOSE SUIVANT UNE BRÛLURE SÉVÈRE	52
3.5 INDUCTION DE L'ANERGIE POST-BRÛLURE.....	54
SECTION 2: ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	58
 BURN INJURY INDUCES A CHANGE IN T-CELL HOMEOSTASIS AFFECTING PREFERENTIALLY CD4+ T CELLS.	
CONCLUSION.....	94
LISTE DES RÉFÉRENCES.....	101

Remerciements

Par cette chance qui m'est allouée, j'aimerais remercier mon directeur de recherche Dr. Jacques Bernier. Au cours des deux dernières années, Jacques a su m'enseigner la passion de la science, développer mon sens critique, mon intérêt à la recherche et afin, accroître un sentiment d'accomplissement et une confiance en soi. Bâtir son avenir avec succès demande à prime abord d'avoir une formation de pointe, formation que j'ai eu la chance d'obtenir au sein du laboratoire du Dr. Jacques Bernier. Ainsi, Jacques je te suis grandement reconnaissante pour tes habiletés, ton savoir et ta grande générosité.

De plus, j'aimerais remercier Claudine Hamelin dont l'aide et le support ont été grandement appréciés. Par son expertise, elle a su m'enseigner les techniques et le travail de laboratoire qui s'avèreront toujours utiles au courant de ma carrière. Merci Claudine pour ton enthousiasme, ta patience illimitée, ton sourire et ton petit brin de folie.

De plus, j'aimerais remercier les étudiants de ce laboratoire qui ont su m'apporter de l'aide en temps nécessaire et qui ont participé à créer ce bel environnement de travail. Un remerciement spécial pour mon coéquipier, Michele D'Elia, dont les conseils, la rigueur du travail et la passion du dépassement m'ont apporté beaucoup au courant de ces deux dernières années.

Liste des abréviations

[Ca²⁺]_i : Concentration de calcium intracellulaire
AA : Acide Arachidonique
ADN: Acide désoxyribonucléique
ADP : Adénosine diphosphate
AICD : Mort cellulaire induite par activation (activation –induced cell death)
AMP_c : Adénosine monophosphate cyclique
APAF-1 : Facteur d'activation de protéase apoptotique-1
APL : Ligands peptidiques altérés (altered peptide ligands)
ARN: Acide ribonucléique
ARN_m : Messenger de l'acide ribonucléique
ATP: Adénosine triphosphate
BcR: Récepteur des cellules B
Caspase: Cystéine aspartate protéase
CCR : Récepteur cellulaire à chimiokines (chemokine cell receptor)
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
ConA : Concanavaline A
COX : Cyclooxygénase
CPA : Cellule présentatrice d'antigène
CR : Récepteur aux protéines du complément (Complement receptor)
CSF : Facteur de stimulation de colonies (colony-stimulating factors)
CTL : Cellule T cytotoxique
DAG : Diacylglycérol
DD : Domaine de mort (Death domain)
DED : Domaine de mort effecteur (Death effector domain)
DN: Double-négative
DP : Double-positive
DR : Récepteur de mort
EP : Récepteur spécifique à PGE₂
FasL : Ligand de Fas
GATA3 : Facteur de transcription reconnaissant la séquence tétranucléotide GATA
GDP : Guanosine diphosphate
GM-CSF : Facteur de stimulation de colonies des granulocytes et macrophages
GTP: Guanosine triphosphate
HSP: Heat shock protein
IAP : Protéine inhibitrice de l'apoptose
ICAM : Molécule d'adhésion intracellulaire
IEL : Lymphocyte intraépithélial (intraepithelial lymphocytes)
Ig: Immunoglobuline
IL: interleukine
IL-2 : Interleukine 2
IL-2R : Récepteur à l'IL-2
IL-2r : Interleukine 2 recombinant
iNOS : Oxyde nitrique synthétase inductible
IP₃ : Inositol triphosphate
IRF-1 : facteur régulateur de l'interféron-1 (interferon regulator factor-1)
ITAM : Motif d'activation de tyrosines
JNK : Jun kinase

LAT: Éditeur de lien pour l'activation des cellules T (linker for activation of T cells)
 LPS : Lipopolysaccharides
 LTB₄: Leukotriène B₄
 MAPK: Protéine kinase activée par des mitogènes
 M-CSF : Facteur de stimulation de colonies des macrophages
 MMR : Récepteur à mannose des macrophages (macrophage mannose receptor)
 NF-AT : Facteur nucléaire des cellules T activées (nuclear factor of activated T cells)
 NF-κB: Facteur nucléaire κB
 NK : Natural killer cells
 NO : Oxyde nitrique
 NRE : Éléments régulateurs négatifs
 PG: Prostaglandines
 PGDH : 15-OH déhydrogénase prostaglandine
 PGE₂ : Prostaglandine E₂
 PHA : Phytohémaglutine
 PIP₂ : Phosphatidylinositol 4-5 biphosphates
 PKC : Phosphate kinase C
 PLA₂ : Phospholipase A₂
 PLC : Phospholipase C
 RAG1 : Gène recombinant d'activation -1 (recombination activation gene-1)
 RAG2 : Gène recombinant d'activation -2 (recombination activation gene-2)
 SH : Région d'homologie avec Src
 SPL76 : Protéine de leucocyte de 76 kDa contenant un domaine SH2 (SH2-domain containing leucocyte protein of 76 kD)
 SRIS : Syndrome d'une réponse inflammatoire systémique
 STAT : Signal transducteur et activateur de transcription-1 (signal transducer and activator of transcription-1)
 T_A: Cellules T auxiliaires
 T_C: Cellules T cytotoxiques
 TcR: Récepteur des cellules T
 TGF-β: Facteur de croissance transformant β (transforming growth factor β)
 TLR : Récepteur à Toll (Toll-like receptor)
 TNF: Facteur de nécrose tumorale (Tumor necrosis factor) α ou β
 TNFR : Récepteur de facteur de nécrose
 TRADD : Protéine homologue et associée à TNF avec un domaine de mort
 ZAP-70 : Protéine de 70 kDa associé à la chaîne zeta

Liste des figures

<u>FIGURE 1 : COMPOSANTES DU COMPLÈMENT ET DES EFFETS DÉCOULANT DE SON ACTIVATION</u>	6
<u>FIGURE 2 : VOIES DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRE MENANT À L'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T SUITE À LA LIAISON DU TCR</u>	12
<u>FIGURE 3 : STRUCTURE D'UNE PRO-CASPASE ET DE SON DÉRIVÉ ACTIF APRÈS PROTÉOLYSE</u>	25
<u>FIGURE 4 : VOIE D'ACTIVATION DES CASPASES PAR LES RÉCEPTEURS DE MORT</u>	26
<u>FIGURE 5 : EFFETS DÉCOULANT D'UNE BRÛLURE SÉVÈRE</u>	34
<u>FIGURE 6 : SCHÉMATISATION DU RÔLE DES MACROPHAGES DANS L'ÉTAT D'IMMUNOSUPPRESSION SUITE AU TRAUMATISME DE LA BRÛLURE</u>	40
<u>FIGURE 7 : GÉNÉRATION DE PROSTAGLANDINES. PAR CLIVAGE DES PHOSPHOLIPIDES MEMBRANAIRES</u>	41

Sommaire

Suite à un traumatisme, telle que la brûlure sévère, on observe une altération du système immunitaire conduisant à un état d'immunosuppression chez les patients. Cette perturbation du système immunitaire a pour conséquence de diminuer les capacités de l'organisme à répondre aux infections secondaires, d'où l'apparition du choc septicémique, principale cause de mortalité observée chez les patients brûlés. L'immunosuppression est d'origine multifactorielle et elle implique en outre le relâchement d'endotoxines suite à une perte de la perméabilité du tractus gastro-intestinal, d'où une translocation bactérienne. Il s'ensuit également une production massive de multiples médiateurs inflammatoires tels que les protéines du complément, les prostaglandines, les radicaux libres, de l'oxyde nitrique, ainsi qu'une perturbation du système hormonal et du système immunitaire.

Le système immunitaire est un réseau complexe où interagissent diverses cellules et molécules dans le but est de générer une protection adéquate à l'organisme contre divers micro-organismes. L'induction d'une réponse immunitaire spécifique implique deux groupes essentiels de cellules : les lymphocytes et les cellules présentatrices de l'antigène (CPA). Il existe deux populations bien définies des lymphocytes T, cellules étant l'un des nombreux types de cellules blanches du sang produites dans la moelle osseuse: les cellules T auxiliaires et les cellules T cytotoxiques, qui se distinguent par leur expression des co-récepteurs CD4 et CD8. Lorsqu'une cellule T naïve reconnaît un complexe antigène-CMH à la surface des cellules présentatrices d'antigène, elle s'active et il s'ensuit une expansion clonale des cellules T, initiant ainsi une réponse immunitaire primaire. Un contact ultérieur de l'hôte avec un même antigène induira une réponse immunitaire secondaire, qui sera plus rapide et plus forte que la précédente. La sécrétion de cytokines, telles que l'IL-2 et l'IL-12, amène les cellules T naïves activées à proliférer et à se différencier en population de cellules T effectrices ou mémoires. Le bon maintien des fonctions effectrices de ces cellules est dépendant de l'état d'équilibre qui existe entre les divers signaux de survie et les signaux de mort qu'elles reçoivent; où le signal le plus fort influencera son devenir. Suivant un traumatisme, le processus de prolifération, le mode d'activation de ces cellules, le relâchement des molécules essentielles à leur survie (cytokines) ainsi que le processus de mort cellulaire sont des mécanismes vulnérables aux changements provoqués par une brûlure sévère.

L'importance du bon maintien du système immunitaire ainsi que sa grande sensibilité suivant un traumatisme, sont des facteurs qui ont influencé l'établissement de ce projet de recherche. Ainsi,

l'objectif de cette étude était de démontrer et de cibler les effets modulateurs d'une brûlure sévère sur l'immunité d'un organisme, qui dans bien des cas résultait d'un état d'immunosuppression. Des études antérieures ont tenté d'élucider les conséquences d'une brûlure sévère sur l'ensemble des lymphocytes, en étudiant les changements phénotypiques des populations lymphocytaires, leur capacité de prolifération *in vitro* et leur habilité à synthétiser des cytokines. Des études faites dans notre laboratoire, ont également démontré que l'état d'immunosuppression, analysé par divers paramètres, s'établissait au 10^e jour suivant le traumatisme d'une brûlure. À partir de ces analyses, une approche expérimentale a été établie afin d'élucider les altérations des fonctions lymphocytaires suivant une brûlure sévère, soit par leur capacité à proliférer, leur niveau d'expression et d'activation dans la rate, ainsi que leur niveau apoptotique et/ou d'anergie. Nous avons donc étudié à partir d'un modèle murin, soumis à une brûlure sévère correspondant à 20% de la surface totale (TBSA), l'effet du traumatisme d'une brûlure sur l'homéostasie des lymphocytes T tant naïfs qu'effecteurs en relation avec leur niveau d'apoptose et leur état d'anergie, 1, 5 et 10 jours post-trauma.

Un jour suivant le traumatisme d'une brûlure, il a été observé une importante baisse de la cellularité dans la rate, une hausse de la capacité des lymphocytes à proliférer *in vivo* ainsi que augmentation de l'expression des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ naïves, alors que l'induction de l'apoptose est fortement réduite. L'analyse de ces résultats a permis de suggérer qu'à cette période suivant le traumatisme, les fonctions effectrices des lymphocytes sont stimulées dans le but d'induire une réponse immunitaire qui compenserait cette perte massive de cellules dans la rate. À l'opposé, nous avons observé au 10^e jour, une forte induction d'apoptose des cellules CD4⁺ naïves, associée à une activation de ces dernières. Malgré que le nombre de cellules dans la rate soit supérieur au groupe témoin et que le niveau de prolifération des cellules soit à la hausse, les cellules naïves sont incapables d'induire une réponse adéquate 10 jours post-trauma. À ce même jour, nous avons également observé que les cellules T, provenant du groupe-brûlé, étaient non stimulables en présence de cellules présentatrices d'antigènes du groupe témoin, soit les macrophages. De plus, il a été démontré au jour 10 que les macrophages du groupe-brûlé étaient moins efficaces à stimuler les lymphocytes T du groupe témoin. Deux hypothèses émergent de cette dernière observation : (1) qu'une partie des cellules T sont anergiques et/ou (2) que les macrophages sont incapables d'activer les cellules T. Cette étude a donc clairement établi que les cellules T naïves activées étaient fortement en apoptose et par conséquent, elles pourraient en partie responsables de l'état d'immunosuppression suivant une brûlure sévère.

Introduction

Chaque année, 600 personnes sont victimes de brûlures au Québec, soit des brûlures graves du second degré profond et du 3^e degré. Malgré les avancées incroyables qui permettent aux victimes d'être soignées adéquatement, les conséquences de ces blessures peuvent parfois durer plus longtemps qu'on ne le croit. Ainsi, une brûlure sévère couvrant 30% de la surface corporelle impliquera d'importantes altérations sur tous les niveaux de l'organisme, que se soit au niveau corporel, nutritionnel, endocrinien et même immunitaire. Le système immunitaire est grandement affecté suite à une brûlure sévère, d'où l'apparition d'un état d'immunosuppression conduisant à des cas de septicémies. Ainsi, lors d'un traumatisme, le système immunitaire met en branle différents mécanismes de protection tels l'activation de la réponse innée et acquise. Par contre, il en résulte bien souvent une perte de l'équilibre du système immunitaire causée par les effets perturbateurs d'un tel traumatisme sur la capacité de protection d'un organisme. Cette observation nous a donc amenés à étudier les conséquences et les causes des brûlures sévères.

Le système immunitaire est un réseau complexe où interagissent diverses cellules et molécules susceptibles de reconnaître et d'éliminer un grand nombre de pathogènes. L'immunité comporte deux composantes, soit l'immunité innée et l'immunité acquise. L'immunité innée, qui est considérée comme la première ligne de défense, comprend les composantes du complément, les neutrophiles et les macrophages dont l'action rapide a pour but d'enrayer les pathogènes. Si un micro-organisme échappe aux mécanismes de l'immunité innée, la réponse immunitaire spécifique de l'immunité acquise sera enclenchée. Les lymphocytes, étant les effecteurs de l'immunité acquise, seront interpellés afin d'éliminer les micro-organismes. Les deux populations essentielles des lymphocytes sont les lymphocytes B et les lymphocytes T, qui à eux se divisent en cellules T auxiliaires (CD4⁺) et cellules T cytotoxiques (CD8⁺). L'activation de l'immunité acquise requiert la participation des lymphocytes T, qui en réponse à un stimulus mitogène, s'ensuit une expansion clonale de ces cellules pour ensuite se différencier en cellules effectrices. L'activation des lymphocytes T est initiée par les récepteurs de reconnaissance à l'antigène (TcR) et les molécules de co-stimulation, qui sont eux aussi contrôlés par les voies de signalisation intracellulaire. Par la suite, les cytokines sécrétées par les cellules T activées régulent la prolifération et la différenciation de nombreuses cellules effectrices, dont les cellules T, les cellules B et même les cellules de l'immunité non spécifique. L'homéostasie est un processus qui maintient généralement un état d'équilibre dans lequel la production de cellules T matures est proportionnelle à la perte de ces dernières. La régulation de ce processus est assurée par différents mécanismes, dont le contrôle des taux de cytokines produites par les cellules activées, la

régulation de l'expression de certains récepteurs, l'élimination de certaines cellules par l'induction contrôlée de la mort cellulaire, etc. La mort cellulaire programmée, processus dénommé apoptose pendant lequel la cellule participe à sa propre élimination, est un facteur essentiel dans la régulation de l'homéostasie de nombreux types cellulaires. L'expression de divers gènes accompagne l'apoptose des lymphocytes; soit les gènes pro-apoptotiques versus les gènes anti-apoptotiques. Cependant suite à un traumatisme, la régulation de ces diverses gènes est quelque peu perturbée accentuant ainsi ou inhibant le processus de mort cellulaire. Ces altérations auront des répercussions directes sur la régulation de la réponse immunitaire.

Lorsque l'une des nombreuses composantes de l'immunité innée ou l'immunité acquise est défectueuse suite à une perte de fonction en raison d'un dommage physique, l'hôte souffre d'une immunodéficience. Diverses études ont observé une baisse des fonctions du système immunitaire chez les grands brûlés, notamment une diminution de la réponse d'hypersensibilité de type retardée lors d'une allogreffe, atténuant ainsi l'induction d'une réponse inflammatoire aiguë induite par les cellules T activées. Malgré qu'une brûlure sévère a pour avantage de diminuer les probabilités que l'hôte rejette une greffe, il n'en demeure pas moins que les conséquences d'un état d'immunosuppression chez les grands brûlés sont graves. Ce paradoxe du système immunitaire comprend une perte des fonctions protectrices de la peau, l'introduction de pathogènes, l'altération des fonctions des neutrophiles, du complément, des macrophages et des lymphocytes, une augmentation de substances immunosuppressives, des hormones de stress et des médiateurs de l'inflammation. L'état d'immunosuppression des patients brûlés s'explique également par diverses perturbations des fonctions effectrices des lymphocytes T. Suivant une brûlure sévère, il a été noté une réduction de la prolifération des lymphocytes T, une augmentation des cellules T suppressives ainsi qu'une diminution de la synthèse des cytokines et de leurs récepteurs respectifs nécessaires à l'activation des lymphocytes T. De plus, cette diminution des fonctions lymphocytaires peut être la conséquence d'une induction de la mort cellulaire ou tout simplement de l'établissement d'un état d'anergie.

À partir d'un modèle murin soumis à une brûlure sévère, nous avons étudié l'effet de ce traumatisme au niveau de l'immunomodulation des lymphocytes T. Dans cette perspective, les objectifs de ce projet ont été de déterminer l'effet de la brûlure sur la capacité de prolifération *in vivo* des lymphocytes T et sur le niveau d'expression des sous-populations lymphocytaires dans la rate. De plus, la nature des lymphocytes T activés a été définie en corrélation avec leur taux d'induction d'apoptose et/ou d'anergie. Ainsi, cette étude à long terme sera profitable pour le traitement des patients gravement brûlés afin d'augmenter leurs chances de survie au syndrome d'un choc septique.

SECTION 1

REVUE DE LITTÉRATURE

CHAPITRE 1

LYMPHOCYTES T

1.1 Introduction

Le système immunitaire d'un être sain, est un réseau complexe où interagissent différentes cellules et molécules, dans le but de reconnaître et de tolérer les protéines du soi ainsi que de reconnaître et rejeter les pathogènes. Il suppose donc que le système immunitaire est capable de reconnaître certaines structures qui lui sont spécifiques et qui constitue le soi de même que des structures qui ne leur appartiennent pas, soit le non soi. L'immunité possède deux mécanismes, qui apparaissent successivement au cours de l'évolution, soit l'immunité innée et l'immunité acquise.

1.1.1 Immunité innée

L'immunité innée, dite non spécifique, est polyvalente car quel que soit l'agent infectieux la réaction est sensiblement toujours la même et elle est rapide. Elle est impliquée dans la génération d'une réponse inflammatoire enclenchée par les macrophages, les leucocytes polymorphonucléaires et les mastocytes, tous effecteurs de l'immunité innée. L'immunité innée a recourt à plusieurs molécules exprimées à la surface de cellules, dans les compartiments intracellulaires ou sécrétées dans la circulation sanguine (Medzhitov & Janeway, 1997). Cette expression de molécules confère à l'immunité innée une capacité de reconnaissance spécifique à certains Ag (antigène), et une génération de protéines adaptatrices spécifiques aux Ag (Janeway et Medzhitov, 2002). Les principales fonctions des molécules de reconnaissance englobent l'opsonisation, l'activation de la cascade du complément et de la coagulation, la phagocytose, l'activation de signaux pro-inflammatoires et l'induction d'apoptose. Par exemple, les récepteurs à la surface des macrophages, comme le récepteur à mannose des macrophages (MMR), ont pour fonction de reconnaître les pathogènes et d'activer la phagocytose. Par contre, les virus et certaines bactéries peuvent pénétrer les compartiments intracellulaires, tel que le cytosol. Les molécules exprimées dans le cytosol détectent la présence de ces pathogènes intracellulaires et inhibent leur réplication virale. Les récepteurs Toll (TLR) sont également impliqués dans la reconnaissance de pathogènes tels que les lipopolysaccharides (LPS) (Medzhitov, Preston-Hurlburt et Janeway, 1997). Après la liaison du pathogène avec le récepteur TLR, ceux-ci induisent l'expression de différents gènes de défense, par exemple ceux des cytokines pro-inflammatoires, des

chimiokines, des peptides anti-microbiens et des molécules de co-stimulation. Jusqu'à présent 10 TLR ont été identifiés chez l'humain et ils diffèrent entre eux par la reconnaissance de leurs ligands spécifiques. Suite à la reconnaissance des LPS par le TLR4, ce dernier induit l'expression de cytokines inflammatoires et l'expression de molécules de co-stimulation (Medzhitov, Preston-Hurlburt et Janeway, 1997).

Malgré que la reconnaissance des pathogènes par l'immunité innée demeure complexe, son implication demeure toujours la même, soit de protéger l'organisme d'une variété d'antigènes. Pour ce faire, la première barrière physique à toute invasion microbienne se trouve à être la peau. La peau, organe couvrant une grande surface du corps, est la première ligne de défense non spécifique contre les agents infectieux. Elle est la barrière entre le milieu externe et interne, et elle protège contre toute pénétration de pathogènes. Le risque d'infection a lieu lorsque cette barrière physique est lésée, soit par une coupure ou une déchirure. Les protéines du sang telles les composantes du complément et certains médiateurs de l'inflammation font partie intégrante de l'immunité non spécifique. Le système du complément regroupe les protéines de surface qui interagissent avec les molécules du système immunitaire afin d'induire une réponse inflammatoire et humorale. Les fonctions biologiques du complément sont : (1) d'activer la cytolyse en formant des pores au niveau de la membrane cellulaire des pathogènes, (2) d'opsoniser les pathogènes par l'agrégation des protéines du complément, nommées opsonines, attirant aussi les cellules phagocytaires, (3) d'activer une réponse inflammatoire par l'attraction des neutrophiles et des mastocytes et (4) de former des complexes immuns qui se lieront aux récepteurs du complément présents sur les érythrocytes, afin d'être éliminés de la circulation sanguine. Il existe trois voies d'activation du complément initiées par un ensemble de stimuli spécifiques, par contre ces différentes voies partagent des molécules homologues avec des fonctions semblables (Goldsby, Kindt et Osborne, 2000).

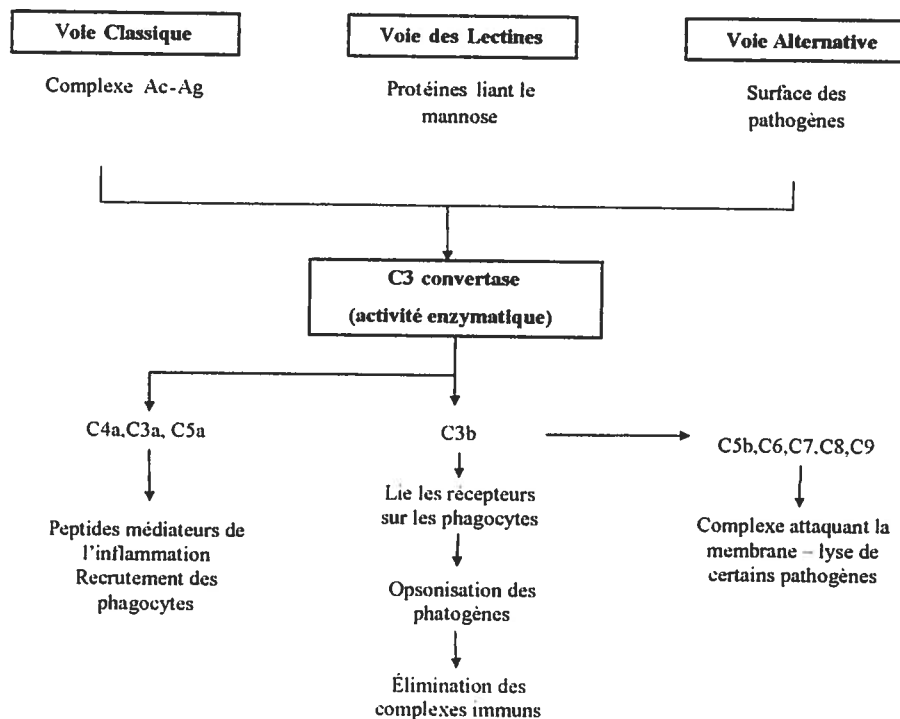


Figure 1: Composantes du complément et des effets découlant de son activation.

(modifié de Goldsby, Kindt et Osborne, 2000)

Les cellules phagocytaires telles les neutrophiles et les macrophages, et autres cellules leucocytaires, comme les cellules dendritiques et les cellules NK (Natural Killer) constituent la ligne défensive de l'immunité innée. Ces dernières cellules deviennent actives lors d'une réponse inflammatoire, signe d'une infection avec un agent infectieux. Les neutrophiles que l'on nomme leucocytes polymorphonucléaires, par leur morphologie bi-lobée, sont les cellules se retrouvant en plus grand nombre dans la circulation sanguine lors d'une infection. Ils répondent rapidement à divers stimuli chémoattractants, phagocytent les microbes et peuvent être activés par des cytokines produites par les macrophages ou les cellules endothéliales, préalablement activés. Les neutrophiles possèdent également des récepteurs spécifiques aux immunoglobulines IgG, leur conférant une certaine fonction dans l'immunité humorale. De plus, ils détectent par l'expression de récepteurs de surface, les protéines du complément liées aux pathogènes aux sites d'inflammation dans le but d'activer la phagocytose.

Les phagocytes mononucléaires sont synthétisés dans la moelle osseuse et après maturation et activation, ils acquièrent diverses formes morphologiques. Différents facteurs de croissance sont nécessaires pour la différenciation et la maturation des cellules hématopoïétiques en cellules phagocytaires (Goldsby, Kindt et Osborne, 2000). En présence du facteur de stimulation de colonies (CSF) spécifiques des macrophages (M-CSF) et/ou de la lignée des granulocyte-macrophages (GM-CSF), les progéniteurs se différencieront en monocytes (Wang *et al.*, 1988). Les premières cellules à entrer en circulation sont les monocytes qui se différencieront en macrophages une fois dans les tissus. Les phagocytes mononucléaires jouent un rôle important dans l'immunité innée et peuvent servir de lien entre cette dernière et l'immunité acquise. Les fonctions principales des phagocytes mononucléaires sont de phagocyter les pathogènes, les microbes, les antigènes et même les tissus endommagés du soi. La reconnaissance des pathogènes se fait au moyen de récepteurs de surface tels que les phospholipides et les sucres, par exemple le récepteur à mannose (Aderem et Underhill, 1999). Le récepteur à mannose des macrophages reconnaît le mannose et le fucose, sucres présents à la surface des pathogènes, et enclenchent la phagocytose de ces derniers (Aderem et Underhill, 1999). Les récepteurs C3b ou C3bi présents sur les macrophages, sont également des récepteurs capables de reconnaître les bactéries opsonisées, par les protéines du complément, pour ensuite procéder à la phagocytose (Aderem et Underhill, 1999). Divers récepteurs participent aussi à la phagocytose des particules opsonisées, soit le récepteur spécifique aux protéines du complément (CR) CR1, CR3 et CR4 tous exprimés à la surface des macrophages (Aderem et Underhill, 1999). Après activation, les macrophages peuvent sécréter des enzymes protéolytiques, des dérivés de l'oxyde nitrique (NO) qui induisent la mort de certains pathogènes (Flynn & Chan, 2001). Ainsi, les cellules phagocytaires activées par des agents comme l'INF- γ et le TNF- α , génèrent du NO. Après reconnaissance des pathogènes, les macrophages et les cellules dendritiques sécrèteront des chimiokines et des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, IL-6 et TNF- α possédant des effets anti-viraux directs ou indirects (Aderem et Underhill, 1999).

Par contre, dans certains cas, l'immunité innée est incapable d'enrayer l'agent infectieux d'où la nécessité d'activer l'immunité acquise. Ainsi l'immunité innée peut donner des informations pertinentes de l'agent infectieux à l'immunité acquise au moyen de l'expression de molécules de co-stimulation, telles le CD80 et le CD86 (Hart, 1997). Ces dernières molécules de co-stimulation sont présentes à la surface des cellules présentatrices d'antigènes, comme les cellules dendritiques qui jouent un rôle primordial contre les agents infectieux. Les cellules dendritiques de la peau, communément appelées cellules de Langerhans, ont la capacité de présenter les antigènes par la présence d'endosomes et de lysosomes mais possèdent peu d'activité phagocytaire en comparaison

aux macrophages et expriment en majeure partie le CMH de classe II (alors que les macrophages expriment essentiellement le CMH I) leur conférant la capacité d'activer les lymphocytes T naïfs (Hart, 1997). Les cellules dendritiques en maturation migrent vers le cortex profond des ganglions et présentent l'antigène sous forme de peptides associés au CMH de classe I ou II, permettant ainsi l'interaction avec des lymphocytes T CD8⁺ ou CD4⁺ dans le but d'induire une réponse immunitaire spécifique (Hart, 1997). Les composants du CMH ainsi que les complexes CMH-peptide sont 10-100 fois plus présents sur les cellules dendritiques que sur tout autre monocyte ou cellules B (Goldsby, Kindt et Osborne, 2000). La reconnaissance du CMH-peptide avec le TcR constitue le premier signal entre les cellules CD4⁺ naïves et les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques augmentent les niveaux d'expression de CMH II, des molécules de co-stimulation telles que CD40, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), absentes chez les cellules de Langerhans. Les cellules dendritiques expriment également des molécules d'adhésion ICAM-1, ICAM-3 et LFA-3 et sécrètent de l'IL-12 (Dieu et *al.*, 1998). Outre la sécrétion d'IL-12 et d'IL-2, les cellules dendritiques matures sécrètent également de l'IL-6 et TNF- α . Il a été démontré dernièrement qu'après activation bactérienne, les cellules dendritiques matures sécrétaient également de l'IL-2, cytokine essentielle à la différenciation et à la prolifération des cellules T naïves et à l'activation des cellules NK (Granucci et *al.*, 2001). Les cellules dendritiques exprimant des complexes CMH I-peptide ainsi que des molécules de co-stimulation, peuvent également activer les cellules T CD8 naïves (Matthew et *al.*, 1998).

Selon l'expression ou non du récepteur CD11, les cellules dendritiques vont initier une réponse de type Th1 ou Th2, se différenciant selon la synthèse de cytokines. En fait, les mécanismes des cellules dendritiques régulant la balance entre les réponses de type Th1 et Th2 sont très complexes. Selon la localisation des cellules dendritiques, la durée de leur activation et les facteurs environnementaux, il y aura prédominance de Th1 ou Th2 (Maldonado-Lopez-Lopez, 2001).

1.1.2. Immunité acquise

Il existe des mécanismes spécifiques activés par la présence de pathogènes augmentant les possibilités de l'organisme à enrayer ces agents infectieux. Cette réponse spécifique se nomme immunité acquise et se caractérise par une haute spécificité, une réponse diversifiée générée par le nombre de spécificités antigéniques et une habilité à établir des mémoires immunologiques en cas d'infections subséquentes (Goldsby, Kindt et Osborne, 2000). L'immunité spécifique se divise en immunité humorale et immunité cellulaire. L'immunité humorale se définit par la présence des molécules circulantes, soit les anticorps, capables de reconnaître des antigènes et à contribuer à leur

l'élimination. L'immunité spécifique est l'immunité cellulaire, se définissant par l'activation des lymphocytes T (Goldsby, Kindt et Osborne, 2000)

La réponse spécifique se divise en 3 phases distinctes : (1) la phase de reconnaissance, (2) la phase d'activation et (3) la phase effectrice. La phase de reconnaissance consiste à lier l'antigène associé aux molécules de CMH de classe II exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). La phase d'activation des lymphocytes implique premièrement, la prolifération lymphocytaire, amenant une expansion clonale des lymphocytes spécifiques à l'antigène. Deuxièmement, la différenciation des lymphocytes en cellules effectrices ou en cellules mémoires, dont leur fonction est d'éliminer l'antigène, ou en cas d'infections subséquentes respectivement. Les lymphocytes T activés vont sécréter des cytokines dans le but d'augmenter la phagocytose et de stimuler une réponse inflammatoire. Enfin, la phase effectrice se définit par l'action des lymphocytes différenciés et se terminera par l'élimination des lymphocytes.

1.2 Lymphocytes T

Les lymphocytes T sont les régulateurs de la réponse immunitaire des mammifères contre tous pathogènes. Ils jouent également un rôle important dans les allergies, les rejets de greffe et dans les maladies auto-immunitaires. Le développement et les fonctions des lymphocytes T sont régulés par différentes voies de signalisation qui englobent les molécules de signalisation intracellulaire, des facteurs nucléaires de transcription et des récepteurs cellulaires de surface (Kuo & Leiden, 1999). Le répertoire de cellules T comprend les cellules T auxiliaires ou "helper" (T_H), exprimant la molécule membranaire CD4, et les cellules T cytotoxiques (T_C) exprimant le CD8 (Goldsby, Kindt et Osborne, 2000). Les cellules T $CD4^+$ sont restreintes au CMH de classe II tandis que les cellules T $CD8^+$ reconnaissent les peptides antigéniques liés au CMH de classe I.

1.2.1 Activation des lymphocytes T

La coordination de l'activation des cellules T en réponse à un antigène lié au CMH exprimé à la surface des CPA, permet l'expansion clonale et la différenciation des cellules T spécifiques à un antigène. L'activation des lymphocytes T est contrôlée et induite par diverses voies de signalisation, initiées par la liaison Ag-TcR et les molécules de co-stimulation (Acuto et Cantrell, 2000). Le TcR est constitué d'une unité hétérodimérique extracellulaire formée des chaînes α et β et d'une unité de signalisation essentiellement intracellulaire. Cette unité de signalisation est composée de trois chaînes

différentes CD3 γ , CD3 δ et CD3 ϵ , et d'un homodimère de chaînes ζ , collectivement connues sous le nom de complexe du CD3 (Acuto et Cantrell, 2000). Ces molécules ne possèdent pas d'activité enzymatique intrinsèque mais elles peuvent, à leur tour, lier des tyrosines kinases situées au niveau de la portion intracellulaire (ITAM). Lorsque ces motifs d'activation sont phosphorylés par des tyrosines kinases lors du processus de signalisation, ceux-ci entrent en interaction avec des protéines tyrosines kinases (PTK) essentielles aux signaux de l'activation (Alberola-Ila et *al.*, 1997).

La phosphorylation des résidus de tyrosines des chaînes du complexe CD3 est effectuée par les PTK de la famille de Src, p56^{lck} et p56^{fyn} (Acuto et Cantrell, 2000). Après l'engagement du TcR avec le complexe CMH-peptide, les PTK Fyn et Lck s'associent aux queues cytoplasmiques du complexe TcR. Cependant, l'activité de Fyn et Lck, de même que celle de nombreux composants essentiels à la transduction de signaux, est régulée par une phosphorylation au niveau de deux sites. La phosphorylation au niveau du site d'inhibition, consiste à arrêter l'activité enzymatique, tandis que la phosphorylation au niveau du site d'activation est essentielle à l'activité des PTK. Malgré que le site d'activation soit phosphorylé, l'activité enzymatique des PTK n'est possible que si le phosphate d'inhibition n'ait préalablement été éliminé par une tyrosine phosphatase transmembranaire d'inhibition, soit le CD45 (Alberola-Ila et *al.*, 1997).

Étant activées, Fyn et Lck, procèdent à la phosphorylation de tyrosines présentes au niveau des ITAMs du complexe CD3. La phosphorylation de la chaîne ζ , du complexe CD3, crée des sites phosphotyrosine d'arrimage du domaine SH2 permettant le recrutement et l'activation de ZAP-70 (Chan et *al.*, 1992). ZAP-70 est une protéine kinase de 70 kDa, membre de la famille des Syk, et est exprimée exclusivement chez les lymphocytes T, les thymocytes et les cellules NK (Chan et *al.*, 1992). Cependant, cette liaison de ZAP-70 avec le complexe TcR-CD3 est transitoire car ZAP-70 passe rapidement de la phase liée à la phase non-liée, engendrant un processus de compétition entre les signaux de régulation positive et négative (Chang et *al.*, 1992). La protéine ZAP-70 activée conduit à l'activation de nombreuses voies, dont celles initiées par la phosphorylation de la phospholipase $C\gamma_1$ (PLC γ), membre du groupe des phospholipases C. Cette interaction entre le TcR et PLC γ_1 , permet au TcR de réguler l'hydrolyse de phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) et d'augmenter et de contrôler la production de deux produits, soit l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG) (Noh, Shin et Rhee, 1995). IP₃ et DAG vont à leur tour réguler la concentration du calcium intracellulaire (Ca²⁺). L'élévation de Ca²⁺ et DAG active la protéine kinase C (PKC), qui phosphoryle divers substrats cellulaires et initie la libération du facteur nucléaire NF- κ B, facteur de transcription essentiel à l'activation de divers gènes, y compris celui pour l'IL-2 (Negulescu, Shastri et Cahalan,

1994). L'augmentation de Ca^{2+} est critique pendant l'initiation de l'activation des cellules T autant pour l'induction de l'expression des gènes de cytokines que pour contrôler les fonctions effectrices des cellules T.

La forme active du TcR va également se lier avec la protéine G Ras, contenant une activité intrinsèque GTPase qui joue un rôle dans diverses réponses d'activation de différents types cellulaires (Alberola-Ila et *al.*, 1997). La protéine Ras s'associe de façon constitutive avec les domaines SH3 de la molécule adaptatrice Grb2, protéine jouant un rôle d'adaptation en couplant les signaux membranaires avec le facteur d'échange guanine-nucléotide SOS (Acuto et Cantrell, 2000). Chez une cellule T activée, les domaines SH2 Grb2 interagissent avec des résidus de tyrosines phosphorylés de la queue cytoplasmique de la protéine adaptatrice LAT, permettant par la suite la régulation de Ras (Acuto et Cantrell, 2000). LAT étant une protéine de liaison nécessaire à l'activation des lymphocytes T (LAT) (Acuto et Cantrell, 2000). Une autre protéine adaptatrice serait également impliquée dans cette régulation, soit la protéine SLP76 dont on ne connaît pas spécifiquement son rôle (Acuto et Cantrell, 2000). Immédiatement après les liaisons des protéines adaptatrices avec Ras, le facteur d'échange SOS permet à cette dernière d'échanger son guanosine diphosphate (GDP) lié contre du guanosine triphosphate (GTP), lui conférant la forme active. Ras activée enclenche l'initiation de la voie de la MAP kinase, qui consiste en une cascade de phosphorylations successives de protéines kinases, telles que ERK-1 et ERK-2 et des enzymes de phosphorylation des résidus de thréonine/tyrosine appelés MAP-kinases kinases (MKK) (Wassarman, Therrien et Rubin, 1995). De cette voie de signalisation conduit à la phosphorylation des facteurs de transcription Fos et Jun et de leur formation en l'hétérodimère AP1, étant nécessaire à la transcription des gènes essentiels à la prolifération cellulaire et à la synthèse d'IL-2. Selon une étude, le facteur de transcription AP-1 régule également l'expression du marqueur d'activation CD69, glycoprotéine qui est rapidement exprimée à la surface des lymphocytes T suite à leur activation (Castellanos et *al.*, 1997).

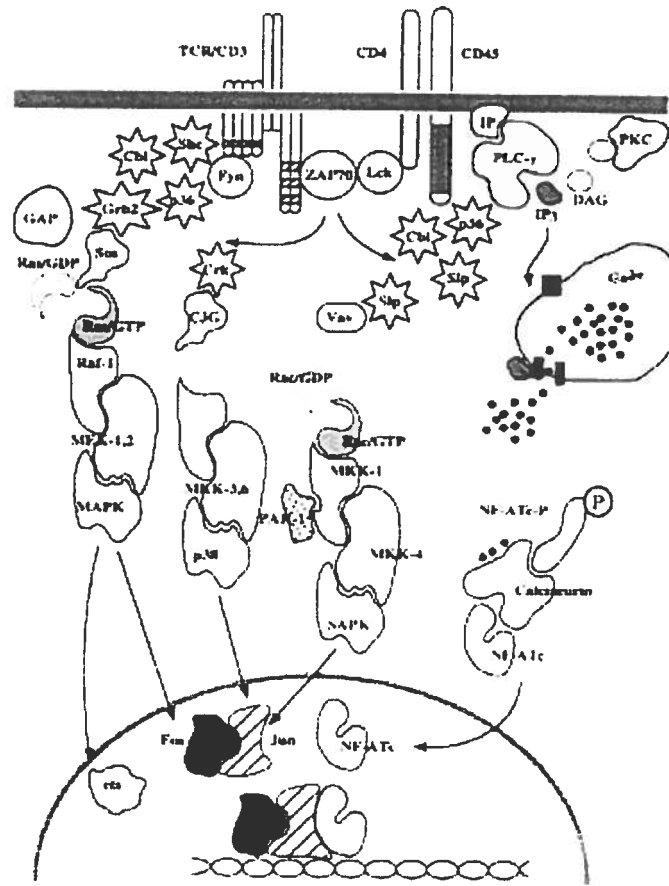


Figure 2: Voies de signalisation intracellulaire menant à l'activation des lymphocytes T suite à la liaison du TcR

(Modifié de Alberola-Ila et *al.*, 1997)

1.2.2. Rôle des molécules de co-stimulation

L'activation par le TcR des cellules T n'est pas suffisante par elle-même pour activer complètement les cellules T naïves. Les cellules naïves prolifèrent peu et ne produisent pas d'IL-2 après une forte stimulation par le TcR seul. À l'opposé, les cellules mémoires ont une capacité maximale de proliférer et elles synthétisent de l'IL-2 après ce type de stimuli (Croft, Bradley et Swain, 1994). Pour les cellules naïves, outre le signal généré par l'interaction peptide/CMH et le complexe TcR/CD3, des signaux de co-stimulation en interaction avec la molécule CD28 des cellules T sont nécessaires (Goldsby, Kindt et Osborne, 2000). Les molécules B7, soit B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86), exprimées sur les CPA sont les ligands respectifs du CD28 (Goldsby, Kindt et Osborne, 2000). Ces molécules de co-stimulation sont exprimées de façon constitutive sur les cellules dendritiques et sont induites sur les macrophages et les cellules B, une fois activés. Divers stimuli induisent l'expression de CD80 et

CD86 sur les cellules dendritiques. Des études ont démontré l'influence de la présence de cytokines et autres stimuli sur les cellules de Langerhans de souris. Ces dernières expriment CD80/CD86 en présence de GM-CSF et de la cytokine IL-4 alors qu'INF- γ induit seulement l'expression de CD86 (Aderem et Underhill, 1999).

Lorsqu'il y a interaction entre B7 et CD28, il y a induction d'un signal de co-stimulation positif à la cellule T. L'interaction entre les molécules B7 des CPA avec leurs ligands CD28 augmente la prolifération et la sécrétion d'IL-2, l'expression du récepteur IL-2R α (CD25) des cellules T (Carreno et Collins, 2002). La co-stimulation du CD80 mène à une réponse T de type Th1 alors que la stimulation via CD86 convergerait vers une réponse de type Th2. Cependant, le signal délivré par l'interaction B7-CTLA-4, est d'inhiber l'activation des cellules T (Waterhouse et *al.*, 1996). L'expression de la molécule CD28 est présente autant chez les cellules T non activées que les cellules activées, alors que CTLA-4 passerait du cytoplasme à la surface des cellules T seulement après activation (Carreno et Collins, 2002). Malgré que CTLA-4 soit exprimé à un moindre taux que CD28, celui-ci est un puissant compétiteur pour les molécules B7, puisqu'il possède une plus grande affinité pour ces molécules de co-stimulation que CD28 (Carreno et Collins, 2002). La molécule CTLA-4 a pour but de réguler la prolifération ainsi que l'activation des cellules T, jouant un rôle dans l'homéostasie des cellules T. (Waterhouse et *al.*, 1996).

1.2.3. Les lymphocytes T auxiliaires ou "helper" (T_H)

Les cellules T CD4⁺ auxiliaires (T_H pour T auxiliaire), quittent le thymus après différenciation et résident dans les organes lymphoïdes secondaires, comme les ganglions, les plaques de Payer et la rate (Weninger et *al.*, 2001). Cette forte concentration de cellules naïves dans le paracortex des ganglions s'explique par le fait que les cellules naïves expriment un ensemble de récepteurs propres à elles, qui lient certains ligands uniquement exprimés au niveau des vaisseaux sanguins spécialisés des ganglions que l'on nomme les veinules postcapillaires. Les cellules naïves expriment fortement le récepteur CD62L, ce qui permet aux cellules de rouler tout le long des parois vénale des ganglions, et le récepteur aux chimiokines (CCR) 7, lequel optimise l'activation des cellules naïves (Jenkins et *al.* 2001). Les veinules post-capillaires sont les seuls vaisseaux sanguins qui peuvent exprimer les ligands spécifiques à ces récepteurs, c'est-à-dire Glycam-1 pour le récepteur CD62L, et CC34, ELC et SLC pour le récepteur CCR7. Ainsi, les cellules T naïves demeureront pour plusieurs jours dans le paracortex des ganglions, tant qu'il y aura production des chimiokines ELC et SLC par les cellules du

stroma (Campbell et Butcher, 2000). Après avoir passé 24 heures dans le paracortex des ganglions, sans avoir rencontré un antigène, les cellules T naïves quittent cette région par les canaux lymphatiques efférents pour rejoindre la circulation sanguine.

Les cellules T CD4⁺ naïves une fois différenciées en cellules effectrices ou mémoires, expriment moins de molécules d'adhésion pour les ganglions, telles CD62L (L-sélectine), et retournent au niveau de la circulation sanguine par la voie lymphatique efférente (Dutton, Bradley et Swain, 1998). Les cellules effectrices ou mémoires résident plutôt au niveau des sites d'inflammation, où il y a pénétration de l'antigène. Les cytokines produites au site d'inflammation induisent l'expression d'intégrines sur les cellules T activées, dont leurs ligands respectifs se retrouvent au niveau des cellules endothéliales (Dutton, Bradley et Swain, 1998). Une cellule T qui reconnaît un antigène durant sa migration dans les tissus extravasculaires, est stimulée et son affinité pour les intégrines et l'expression de CD44 augmentent (Dutton, Bradley et Swain, 1998; Weninger et *al.*, 2001). Des études faites à partir de souris déficientes en intégrine $\beta 7$ ont démontré l'importance critique de ces dernières pour la migration des lymphocytes (Hamann et *al.*, 1994). Ainsi, les cellules T activées, par un antigène spécifique, sont retenues au site où l'antigène persiste. Par contre, les cellules qui ne reconnaissent aucun antigène sont remises en circulation et peuvent retourner vers les organes lymphoïdes secondaires, alors que les cellules T activées demeurent au niveau des sites d'inflammation (Mackay, Marston et Dudler, 1990).

La population de cellules T CD4⁺ mémoires dérive des cellules T CD4⁺ naïves et des cellules T CD4⁺ effectrices après la reconnaissance antigénique (Dutton, Bradley et Swain, 1998). Certaines cellules T mémoires persistent dans le système pour des mois et même des années, tandis que d'autres cellules mémoires ont de courtes durées de vie, maintenues dans l'organisme par une activation continue en raison de la persistance antigénique. Les cellules CD4 mémoires se différencient des cellules CD4 naïves par l'expression de différentes molécules de surface. Les cellules CD4 naïves expriment un haut taux de CD62L et de CD45RB et un faible taux de CD44 (CD62L^{HIGH}, CD45RB^{HIGH}, CD44^{LOW}) (Dutton, Bradley et Swain, 1998). Après activation les cellules T CD4 expriment CD62L^{LOW}, CD45RB^{LOW}, CD44^{HIGH}, en plus d'une régulation des intégrines $\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_4\beta_7$, ainsi que LFA-1, ICAM-1 et CD43 (Boursalian et Bottomly, 1999). Les cellules T CD4⁺ naïves produisent seulement de l'IL-2, IL-3 et TNF- α lorsqu'elles sont activées alors que les cellules mémoires produisent un plus grand nombre de cytokines, telles que l'IL-4, l'INF- γ , l'IL-5 et l'IL-6 (Croft, Bradley et Swain, 1994). Les cellules T mémoires autant que les cellules T effectrices nécessitent un niveau d'expression faible des molécules de co-stimulation lors de leur activation. Une étude de comparaison directe, entre les

cellules T naïves et T mémoires, a démontré que les cellules mémoires répondent mieux aux liaisons croisées du TcR, induites par l'anticorps anti-CD3 ou anti-V β , en absence ou à un faible taux d'expression des molécules de co-stimulation dans des conditions identiques (Croft, Bradley et Swain, 1994). Les cellules T effectrices répondent encore plus efficacement en absence de molécules de co-stimulation que les T cellules mémoires, leur conférant ainsi le pouvoir d'être stimulées par un plus grand nombre de CPA afin de générer une réponse immunitaire plus vaste. Ainsi, les cellules T naïves prennent de 4 à 5 jours pour se différencier en cellules T effectrices, alors que les cellules T effectrices et T mémoires ne prennent que 1 à 2 jours pour induire une réponse lors d'une seconde stimulation. La sécrétion de diverses cytokines, comme l'IL-4 et l'IL-5, par les cellules T CD4⁺ mémoires lors d'une seconde stimulation, permet à celles-ci d'initier la différenciation des cellules B en plasmocytes (Dutton, Bradley et Swain, 1998). Les cellules T CD4⁺ naïves étant incapables de stimuler autant les cellules B, les cellules T effectrices et les cellules T mémoires jouent un rôle important dans l'induction d'une réponse humorale. Après activation des cellules T_H, celles-ci expriment le ligand CD40L, appartenant à la famille des récepteurs de facteurs de nécrose tumorale (TNFR). Ce ligand permet donc d'interagir avec la glycoprotéine CD40, exprimée sur les cellules B naïves (Goldsby, Kindt et Osborne, 2000). Cette interaction délivre un signal aux lymphocytes B qui, de concert avec le signal entre les Ig, amène la cellule B en division cellulaire. Le rôle de la protéine membranaire des cellules T_H, le CD40L, dans l'activation des cellules B a été démontré lors d'expérimentations, où les cellules B naïves étaient incubées avec un antigène et des membranes plasmiques préparées à partir des cellules T_H au repos et des cellules T_H activées. Les résultats ont prouvé que seules les cellules T_H activées induisaient la prolifération des cellules B (Goldsby, Kindt et Osborne, 2000). Outre l'interaction avec des protéines membranaires, les cellules B ne peuvent se différencier en l'absence de cytokines, essentiellement synthétisées par les cellules T_H activées. Dès le début de la prolifération des cellules B, ces dernières expriment des récepteurs membranaires spécifiques à certaines cytokines, comme l'IL-2, l'IL-4 et l'IL-5. Un autre aspect caractérisant les cellules T mémoires, est que ces dernières semblaient être moins sensibles à la mort cellulaire induite par apoptose et/ou anergie, en comparaison avec les cellules T naïves et T effectrices (Dutton, Bradley et Swain, 1998). Les cellules T effectrices sont susceptibles à la mort cellulaire lors d'une 2^e stimulation, par un procédé nommé "induction d'apoptose par activation" (AICD), puisque ces cellules expriment fortement Fas-L, un ligand impliqué dans l'activation des caspases (Wesselborg, Jassen et Kabelitz, 1993). De plus, les cellules naïves expriment hautement CD40L, un ligand des intégrines, qui joue un rôle dans l'induction d'apoptose (Dutton, Bradley et Swain, 1998).

Les récepteurs qui différencient les cellules T CD4⁺ naïves des cellules T CD4⁺ mémoires, ne permettent pas la différenciation des cellules T CD4⁺ effectrices des cellules T CD4⁺ mémoires. Ainsi, les cellules effectrices et mémoires expriment les molécules d'adhésion telles que CD44^{HIGH} et LFA-1^{HIGH}, les isoformes de la glycoprotéine CD45RB^{LOW} et un faible taux de la molécule L-sélectine (CD62L^{LOW}) (Ahmadzadeh, Hussain et Farber, 1999). L'expression de l'isoforme CD45RB sur les cellules effectrices, qui dépend de l'épissage alternatif du gène transcrit CD45, est influencée par les conditions d'activation et les cytokines environnantes, pouvant ainsi servir à la différenciation entre les cellules T effectrices et les cellules T mémoires. De plus, l'expression du récepteur IL-2R (CD25) caractérise les cellules T en division cellulaire et permet d'une certaine façon de distinguer les cellules T effectrices des cellules T mémoires (Ahmadzadeh, Hussain et Farber, 1999). Les cellules T mémoires CD44^{HIGH} expriment à un faible taux les marqueurs d'activation tels que CD25 et CD69 (Dutton, Bradley et Swain, 1998). Les cellules T mémoires peuvent également se différencier des cellules effectrices par l'expression et l'activation des intermédiaires impliqués dans les voies de signalisation lors de l'engagement du TcR. Une étude a démontré que lors de l'engagement du TcR, les cellules T mémoires nécessitaient une phosphorylation moindre des résidus de tyrosine que les cellules T CD4⁺ naïves et effectrices, en plus d'observer une absence de la phosphorylation de ZAP-70 (Hussain, Anderson et Farber, 2002). Alors qu'il y a phosphorylation de la chaîne ζ du complexe CD3, lors de l'engagement du TcR, il y a absence de liaison de la protéine ZAP-70 avec la chaîne ζ chez les cellules T mémoires. Cette absence de liaison de ZAP-70 induit une baisse dramatique de l'expression de SLP-76, et il s'ensuit d'une baisse de la phosphorylation de SLP-76 ainsi que de diverses protéines se liant à Grb2. En absence de l'activation de ZAP-70, on suppose que la protéine p56^{lck} phosphoryle LAT et les résidus de SLP-76 permettant une activation intermédiaire des MAP-kinases (Hussain, Anderson et Farber, 2002). Malgré les différences dans les voies de signalisation, les cellules T CD4⁺ mémoires sont majoritairement des cellules en phase G₀ du cycle cellulaire, qui persistent dans le système immunitaire et répondent de façon plus rapide à une stimulation antigénique (Goldsby, Kindt et Osborne, 2000).

1.2.3.1 Sous-populations des lymphocytes T auxiliaires (T_H)

Les cellules effectrices CD4⁺ se divisent en deux sous-populations caractérisées par leur profil de cytokines qu'elles sécrètent. La sous-population T_H1, sécrète IL-2, l'INF- γ , TNF- β , des cytokines dites pro-inflammatoires alors que la seconde sous-population T_H2, sécrète IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10, des cytokines anti-inflammatoires (Goldsby, Kindt et Osborne, 2000). Les altérations observées au niveau du ratio T_H1/T_H2 jouent un rôle déterminant dans la susceptibilité virale ainsi que les infections parasitaires, les allergies, et les maladies auto-immunitaires. La régulation de ces réponses lymphocytaires se fait en partie au niveau transcriptionnel. Quatre familles de facteurs de transcription ont été identifiées comme étant responsables de la régulation des réponses T_H1/T_H2; soit les familles des STAT, du facteur de transcription GATA3, des protéines NFATp et NFATc ainsi que du c-Maf (Kuo et Leiden, 1999). Deux membres de la famille des STAT, soit STAT 4 et STAT6, influencent la régulation des sous-populations lymphocytaires. Avant l'engagement de la cytokine avec son récepteur spécifique, les protéines STAT sont maintenues dans le cytoplasme sous forme inactive. Suite à la liaison de la cytokine avec son récepteur, les protéines STAT sont phosphorylées par une kinase Janus, de la famille des PTK, et sont rapidement envoyées dans le noyau, où elles se lieront et activeront certains gènes (Kuo et Leiden, 1999). Après stimulation avec l'IL-12, une cytokine qui initie la différenciation des cellules T CD4⁺ naïves vers un phénotype de type T_H1, STAT4 est phosphorylée et devient transcriptionnellement active (Kuo et Leiden, 1999). À partir de souris déficientes en STAT4, diverses études ont clairement identifié le rôle de STAT4 dans la régulation d'une réponse de type T_H1. Ainsi, ces dernières souris présentaient de sévères difficultés à générer une réponse immunitaire après stimulation à l'IL-12 (Thierfelder et *al.*, 1995; Kaplan et *al.*, 1996). La production d'INF γ , la prolifération des cellules T ainsi que les fonctions cytolytiques des cellules NK étaient également affectées chez ces souris déficientes en STAT4. À l'opposer, la protéine STAT6 devient active en réponse à l'IL-4, enclenchant ainsi l'activation des gènes régulés par cette cytokine, soit IgE, IL-4R, FcR et le CMH de classe II (Kotanides et Reich, 1996). Le facteur de transcription GATA3 (facteur de transcription reconnaissant la séquence tétranucléotidique GATA) régule l'expression des cytokines de type T_H2 et la différenciation des cellules T CD4⁺ naïves vers un phénotype de type T_H2 (Zeng et Flavell, 1997). Les protéines NFAT jouent également un rôle dans la régulation des réponses de type T_H1/T_H2. La protéine NFATp semble être un régulateur négatif dans la génération d'une réponse de type T_H2, alors que NFATc participe à la production d'IL-4 et d'IL-6, lors d'une réponse T_H2 (Kiani et *al.*, 1997). Le facteur de transcription c-Maf joue également un rôle dans l'expression d'une réponse de type T_H2 (Ho et *al.*, 1996).

Les cellules T_H1 jouent un rôle dans les fonctions de la médiation cellulaire, telles que l'hypersensibilité de type retardée et l'activation des lymphocytes T cytotoxiques. Cette réponse de type T_H1 est également associée au déclenchement d'une inflammation excessive suite à des lésions tissulaires. L' $INF-\gamma$, qui est une cytokine propre à la population T_H1 , active les macrophages dans le but d'intensifier leur activité microbicide, augmenter leur taux d'expression de CMH de classe II et sécréter des cytokines telles l'IL-12, essentielle à la différenciation des cellules T_H en sous-population T_H1 (Goldsby, Kindt et Osborne, 2000). De plus, l' $INF-\gamma$ augmente l'expression de la sous-unité β du récepteur à l'IL-12 (IL-12R) et freine l'expansion de la population cellules T_H2 . Tout comme pour l' $INF-\gamma$, les cytokines IL-4 et IL-10 empêchent l'expansion de la population cellulaire T_H1 (Goldsby, Kindt et Osborne, 2000). La synthèse d'IL-4 renforce le développement des cellules T_H2 , intervient au niveau de l'activation des cellules B et la sécrétion d'anticorps, diminue l'expression de la sous-unité β du IL-12R, rendant les cellules T insensibles à cette cytokine (Goldsby, Kindt et Osborne, 2000). D'autres types cellulaires, tels les mastocytes, les basophiles, les éosinophiles et les cellules $T\ NK1^+$ peuvent également produire de l'IL-4.

Cette inhibition du développement de l'autre sous-population est connue sous le nom de régulation croisée. Il existe également un troisième sous-groupe que l'on nomme T_H0 , où les cellules produisent de l'IL-2, de l'IL-4, de l'IL-5, de l' $INF-\gamma$ ainsi que d'autres cytokines. Certains groupes de recherche suggèrent que les sous-populations T_H1 et T_H2 dérivent des cellules T_H0 par différenciation (Kamogawa et *al.*, 1993). Les cytokines sécrétées dans l'environnement où se différencient les cellules T_H activées, déterminent la sous-population vers laquelle elles vont se développer. Les macrophages activés en présence de LPS ou de parasites intracellulaires, deviennent la source principale d'IL-12, qui une fois liée à l'IL-12R des cellules T activées, initie la différenciation des cellules T_H en sous-population T_H1 (Murphy et *al.*, 2000). Le développement en cellules T_H1 dépend aussi de l' $INF-\gamma$ qui permet d'intensifier la production d'IL-12 par les cellules dendritiques (Murphy et *al.*, 2000). L'IL-18 (IGIF de interferon gamma inducing factor), faisant partie de la famille des cytokines à IL-1, favorise la prolifération des cellules T_H1 et la production de l' $INF-\gamma$ par ces dernières ainsi que par les cellules NK. Le rôle des cytokines IL-18 et IL-12 dans la transcription du gène de l' $INF-\gamma$ a également été démontré (Murphy et *al.*, 2000).

1.2.4 Les lymphocytes cytotoxiques

Les lymphocytes T cytotoxiques (T_C) sont activés lorsque leurs TcR entrent en interaction avec un complexe antigène-CMH de classe I à la surface d'une cellule, en présence de cytokines appropriées (Goldsby, Kindt et Osborne, 2000). Contrairement aux cellules T_H , la plupart des cellules CTL (lymphocyte T cytotoxique) sécrètent peu de cytokines. Elles acquièrent plutôt la capacité de reconnaître et d'éliminer les cellules du soi altérées, c'est-à-dire les cellules tumorales, les cellules infectées par un virus ou les cellules étrangères d'une greffe. Étant donné que toutes les cellules nucléées de l'organisme expriment des molécules de CMH de classe I, les cellules CTL peuvent reconnaître et éliminer presque toutes cellules altérées. Outre leur capacité à induire la cytolyse des cellules cibles, les cellules $CD8^+$ effectrices ou mémoires après activation antigénique, produisent certaines cytokines telles que l'IFN- γ et le TNF (Harty, Tvinnereim et White, 2000). La réponse immunitaire initiée par les CTL peut être divisée en deux phases qui reflètent bien les différents aspects de la réponse cytotoxique (Goldsby, Kindt et Osborne, 2000). La première phase consiste à activer et différencier les cellules naïves T_C en CTL effecteurs fonctionnels. Dans la seconde phase, les CTL effecteurs reconnaissent les complexes antigène-CMH I des cellules cibles dans le but de détruire ces dernières. La création de cellules CTL à partir des cellules T naïves nécessitent au moins trois signaux successifs. Tout d'abord, un signal spécifique de l'antigène transmis par le complexe TcR suite à la reconnaissance d'un complexe peptide-CMH I. Deuxièmement, un signal de co-stimulation transmis par l'interaction du CD28-B7 exprimé sur les cellules T naïves. Troisièmement, un signal induit par l'interaction de l'IL-2 et de son récepteur de haute affinité IL-2R, conduisant à la prolifération et la différenciation des cellules T_C naïves en cellules CTL effectrices. L'activation par l'antigène induit une cellule T_C naïve à exprimer le récepteur à l'IL-2 et à moindre degré la production d'IL-2. Dans la plupart des cas, les cellules T_C naïves nécessitent de l'IL-2 supplémentaire, produite lors de la prolifération des cellules T_H1 , afin de proliférer et se différencier. De plus, l'activation des cellules T_H1 peut induire une régulation accrue des molécules de co-stimulation à la surface des CPA. De cette façon, les cellules T_H1 jouent un rôle important dans la prolifération et la différenciation des cellules cytotoxiques (Goldsby, Kindt et Osborne, 2000). Par contre, les cellules $CD8^+$ mémoires activées de nouveau nécessitent des exigences moindres d'activation et peuvent proliférer et se différencier en présence d'IL-2, induite seulement lors de la présentation antigénique. L'expression du récepteur à l'IL-2 sur les cellules T_C activées par le complexe peptide-CMH I, favorise l'expansion clonale et l'acquisition de la cytotoxicité par les cellules T_C spécifiques de l'antigène.

Les cellules T $CD8^+$ naïves expriment elles aussi la molécule CD62L, le récepteur CCR7 et l'intégrine LFA-1, qui interagissent avec leur ligand respectif, au niveau des ganglions (Weninger et *al.*, 2001).

Les cellules naïves T CD8⁺ produisent seulement de l'INF γ lorsque celles-ci sont activées (Dutton, Bradley et Swain, 1998). Tout comme pour les cellules T CD4⁺, les cellules T CD8⁺ effectrices peuvent se différencier en cellules mémoires qui persisteront dans le système en partie grâce à la persistance antigénique, la présence de cytokines spécifiques ou les molécules de CMH. La mobilisation des cellules T CD8⁺ mémoires effectrices est extrêmement rapide, due à l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion et la nécessité moindre de molécules de co-stimulation, dans le but d'éliminer toute trace antigénique. Outre le fait que les cellules T CD8⁺ effectrices/mémoires expriment elles aussi la glycoprotéine CD44 et certaines intégrines, les cellules T CD8⁺ mémoires peuvent se différencier en deux sous-groupes. Ces deux sous-groupes se différencient par l'expression du récepteur CCR7. Les cellules mémoires CCR7⁺ qui expriment la L-sélectine, deviennent des cellules effectrices lors d'une stimulation antigénique mais ne possèdent aucune fonction effectrice, alors que les cellules mémoires CCR7⁻ étant L-sélectine(-) possèdent une activité effectrice (Weninger *et al.*, 2001).

1.2.5 Homéostasie des lymphocytes T

L'homéostasie des cellules T est un processus hautement régulé afin de maintenir une réponse immunitaire équilibrée. Dans des conditions normales, le système immunitaire périphérique maintient toujours un nombre constant de cellules T total et conserve également un équilibre entre les cellules T naïves, possédant un TcR non-spécifique générant le répertoire, et les cellules T mémoires, générées lors d'une réponse Ag-spécifique. (Tanchot *et al.*, 1997). Les cellules T effectrices activées ne demeurent qu'un laps de temps dans le système, puisque la majorité meurt par apoptose. Après la clairance de l'antigène, les lymphocytes T activés sont éliminés par apoptose permettant ainsi une régulation de la population des cellules T matures (Rathmell et Thompson, 1999). Le récepteur de mort Fas ainsi que la protéine anti-apoptotique Bcl-2, régulent l'induction de l'apoptose des cellules T, leur conférant ainsi un rôle important dans l'homéostasie de ces dernières (Parijs, Peterson et Abbas, 1998). Après la clairance de l'antigène, l'expression de Bcl-2 diminue progressivement, résultant en une forte induction d'apoptose chez les lymphocytes demeurant. Les lymphocytes T stimulés de façon répétitive sont sujets à l'apoptose par l'activation du récepteur Fas, processus connu sous le nom d'induction de mort cellulaire par activation (AICD) (Parijs, Peterson et Abbas, 1998).

Plusieurs gènes, certaines molécules de surface, des cytokines et le ratio des sous-populations jouent un rôle important dans la régulation de l'homéostasie des cellules T. L'expression de la molécule de

co-stimulation B7 et son interaction avec son récepteur respectif influencent l'homéostasie des cellules T CD4⁺ et CD8⁺, tant au niveau du thymus qu'en périphérie (Yu et *al.*, 2000). Il a été démontré qu'une surexpression ou une suppression de la molécule B7 provoquait un changement dramatique du ratio des cellules CD4⁺/CD8⁺ (Yu et *al.*, 2000). Une diminution d'une population lymphocytaire peut également ébranler l'homéostasie des cellules T. Chez les souris déficientes en cellules T CD4⁺, il a été observé une augmentation du nombre de cellules T CD8⁺ afin de compenser cette perte (Marrack et *al.*, 2000). La présence de cytokines appropriées joue également un rôle important dans l'homéostasie des cellules T. Plusieurs études ont démontré que l'IL-7 et l'IL-4 contribuaient à la survie des cellules T naïves, tant *in vitro* qu'*in vivo* (Hassan et Reen, 1998; Boursalian et Bottomly, 1999). La présence d'interleukines, telles que l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7 et l'IL-15, est également essentielles à la survie des cellules T activées (Marrack et *al.*, 2000). Le récepteur IL-2R α (CD25) est également impliqué dans la régulation de la prolifération et de la mort cellulaire des cellules T (Leung, Morefield et Willeford, 2000). Au cours des dernières années, des lignées de souris présentant des déficiences génétiques spécifiques, ont permis d'élucider certains gènes régulateurs de l'homéostasie des cellules T. Toutefois ce phénomène demeure encore nébuleux. Les cellules T déficientes en une tyrosine kinase, soit la Janus kinase 3 (Jak3), ainsi qu'en la molécule de co-stimulation CTLA-4, présentaient un phénotype similaire caractérisé par une expansion clonale non contrôlée des cellules T périphériques (Gozalo-Sanmillan et *al.*, 2001). Quel que soit le facteur changeant l'homéostasie des cellules, ce processus demeure primordial au bon maintien d'une réponse immunitaire.

CHAPITRE 2

APOPTOSE ET ANERGIE DES LYMPHOCYTES T

2.1 Rôle de l'apoptose

Bien que le phénomène de mort cellulaire programmée ait été observé pour la première fois au 19^e siècle lors de la métamorphose par Vogt, ce n'est que vers 1951 que ce processus a été observé dans plusieurs tissus cellulaires autant chez les invertébrés que chez les vertébrés. En 1972, l'équipe de Kerr a établi différentes caractéristiques morphologiques communes, collectivement nommées apoptose, lors de la mort cellulaire programmée (Cohen et Duke, 1992). Par la suite, Wyllie étudia les procédés biochimiques observés lors de la mort cellulaire programmée, processus induit et ordonné dans lequel la cellule participe activement à sa propre élimination. Ce processus de mort programmée est un facteur essentiel à la régulation de l'homéostasie de nombreux types de populations cellulaires, y compris ceux du système immunitaire (Wyllie, 1980). La mort cellulaire programmée diffère de la nécrose, qui correspond à un processus de mort cellulaire résultant d'une lésion. L'apoptose inclut une diminution du cytosquelette dont il en résulte d'une turgescence (blebbing) de la membrane plasmique, une condensation de la chromatine et une fragmentation de l'ADN au niveau des jonctions internucléosomales qui génère des fragments multiples de 180-200 pb et une diminution du volume cellulaire (Cohen et Duke, 1992; Rathmell et Thompson, 1999). À la suite de ces changements morphologiques, une cellule apoptotique libère de minuscules corps apoptotiques, entourés d'une membrane, qui contiennent des organites intacts. Les macrophages phagocyteront ultérieurement ces corps apoptotiques ainsi que les cellules parvenues à des stades avancés d'apoptose (Aderem et Underhill, 1999). L'expression des molécules de phosphatidylsérine à la surface des cellules apoptotiques après la transition de la perméabilité mitochondriale, est un signal induit afin que les phagocytes reconnaissent les corps apoptotiques (Tanaka et Schroit, 1983). De plus, le relâchement de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 α , l'IL-1 β ainsi que l'IL-18 de sorte à attirer les phagocytes. Cet ensemble d'événements assure que le contenu intracellulaire, pouvant contenir des enzymes protéolytiques ou lytiques, des protéines cationiques et autres molécules oxydantes, ne soit libéré dans le milieu environnant. Le processus d'apoptose n'enclenche pas de réponse inflammatoire locale alors que la nécrose l'induit suite au relâchement du contenu intracellulaire après gonflement et éclatement de la membrane plasmique d'une cellule nécrotique.

L'apoptose est un processus essentiel dans la formation du répertoire des cellules T au niveau du thymus ainsi que dans la régulation des cellules T matures (Rathmell et Thompson, 1999). Au cours du développement des cellules T, l'apoptose élimine les cellules incapables d'entrer en interaction avec le CMH du soi ou les cellules hautement autoréactives. Après leur développement, les cellules T sont amenées à proliférer et à se différencier en cellules effectrices capables d'induire une réponse immunitaire. Ces populations effectrices pourraient être fortement dommageables pour l'hôte une fois l'irradiation de l'antigène, c'est pourquoi l'apoptose agit dans le but d'éliminer la population accrue de cellules T et des cellules T_H activées, qui produisent des taux élevés de cytokines (Rathmell et Thompson, 1999; Cohen et Duke, 1992).

Ce processus de mort cellulaire se divise en deux phases, une phase inductive et une phase effectrice. Une variété de signaux peut initier la voie d'induction du processus de la mort cellulaire, tel qu'un fort engagement du TcR, la présence de glucocorticoïdes, des radiations ionisantes, un choc septique, etc (Cohen et Duke; 1992). En 1980, Wyllie a démontré que suite à une exposition aux glucocorticoïdes, il y avait condensation de la chromatine chez les thymocytes suivi d'une dégradation en nucléosomes multiples (Wyllie, 1980). Ces divers agents utilisent des voies d'induction qui diffèrent les unes des autres mais dont le but ultime est de déclencher une voie effectrice commune. La phase inductive nécessite souvent l'expression de nouveaux gènes et est constituée d'un groupe de signaux activant la phase effectrice. Grâce à des analyses génétiques du nématode *Caenorhabditis elegans*, on a pu identifier les composants nécessaires à l'induction et la régulation de l'apoptose, qui ont été conservés au fil de l'évolution. Au cours du développement du *C. elegans*, sur les 1090 cellules somatiques, 131 cellules sont destinées à entrer en apoptose (Hengartner et Horvitz, 1994). Suite aux observations faites à partir de mutants de *C. elegans*, 11 gènes communs de l'apoptose ont été identifiés (Hengartner et Horvitz, 1994). Ced-3, ced-4 et ced-9 sont les 3 gènes régulateurs de l'apoptose au niveau des cellules somatiques. Des mutations au niveau des gènes ced-3 et ced-4 bloquaient l'induction de la mort cellulaire (Rathmell et Thompson, 1999). Par contre, le gène ced-9 est un gène nécessaire à la survie des cellules somatiques, donc un antagoniste aux gènes ced-3 et ced-4 (Rathmell et Thompson, 1999). Le gène ced-9 est l'homologue de Bcl-2 chez les mammifères, essentiel à la survie des cellules (Vaux, Weissman et Kim, 1992). L'homologue du gène ced-3, qui encode pour une protéase cystéine, est l'enzyme de conversion de l'interleukine IL-1 β (ICE, connue sous le nom de caspase 1) chez les mammifères, qui possède une activité de clivage et une activité pro-apoptotique (Yuan et al, 1993). Le facteur d'activation de protéase apoptotique-1 (APAF-1) est l'homologue du gène ced-4 et il agit en tant que molécule d'adaptation et facilite l'activation de ced-3. (Yuan et Horvitz, 1992). Ces

découvertes ont donc permis d'identifier trois classes de molécules essentielles à la régulation de l'apoptose autant au niveau des nématodes que des mammifères.

La phase effectrice comprend une séquence d'étapes communes à l'apoptose de diverses populations cellulaires. L'induction de mort des cellules cibles par les cellules CTL, est un exemple d'induction de la voie effectrice de l'apoptose. En dehors du thymus, l'apoptose des cellules T matures induite par l'engagement TcR, parfois appelée mort cellulaire induite par activation (AICD), est induite par la voie de Fas et de sa liaison avec son ligand (Ucker, Ashwell et Nickas, 1989). Fas appartient à la famille des récepteurs de facteurs de nécrose tumorale (TNFR) et Fas-L est une molécule étroitement apparentée au facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) (Goldsby, Kindt et Osborne, 2000). Malgré que Fas et Fas-L soient les médiateurs les plus importants dans la mort cellulaire des cellules T matures, d'autres membres de la famille TNFR et de leurs ligands respectifs peuvent expliquer la mort cellulaire enclenchée par le TcR.

2.2. Caspases : exécutrices de l'apoptose

Jusqu'à présent 13 caspases ont été identifiées dont 11 chez l'humain et 2 chez la souris. Les membres de cette famille possèdent une spécificité de clivage aux résidus d'acide aspartique. Ces enzymes jouent un rôle important dans l'induction de la mort cellulaire programmée chez toutes les cellules et leur activité enzymatique peut être détectée chez une cellule ayant entrepris son suicide. Les caspases sont initialement synthétisées en tant que précurseurs, appelés zymogènes, qui démontrent une faible activité enzymatique. La structure primaire pour chaque caspase se compose de 3 domaines : un pro domaine à l'extrémité N-terminale ainsi qu'une séquence codant pour une grande unité (17-21 kDa) et une petite unité enzymatique (10-14 kDa) (Earnshaw, Martins et Kaufmann, 1999). Lors de leur activation, le domaine de la petite unité protéase est premièrement clivé de l'ensemble pro domaine/grande unité, puis ensuite vient le clivage de la grande unité permettant leur relâchement respectif (Earnshaw, Martins et Kaufmann, 1999). La petite et la grande unité vont hétérodimériser pour enfin, former un complexe enzymatique constitué de deux unités d'hétérodimères de la petite et de la grande unité. Ce complexe contient donc deux sites actifs dont les deux sous-unités seraient impliquées (Earnshaw, Martins et Kaufmann, 1999). Chacune des caspases actives dérive de l'association de procaspases ayant subi des clivages internes.

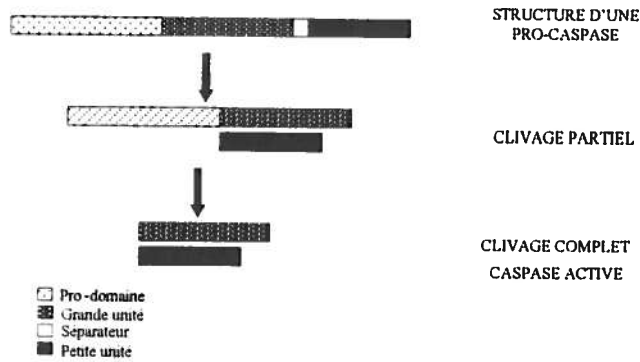


Figure 3 : Structure d'une pro-caspase et de son dérivé actif après protéolyse.

(Modifié de Rathmell et Thompson, 1999)

Les caspases se divisent en deux groupes selon leurs fonctions : les caspases initiateuses et les caspases exécutrices. Les caspases possédant un long pro-domaine, soit les caspases-2, -8, -9 et -10, sont impliquées dans l'initiation de l'apoptose. Tandis que les caspases ayant un court pro-domaine, soit les caspases-3, -6 et -7, sont activées par les caspases initiateuses et exécutent la mort cellulaire programmée (Earnshaw, Martins et Kaufmann, 1999).

Les caspases sont des enzymes peu sélectives puisqu'elles clivent des composantes structurales du cytosquelette et du noyau, en plus de nombreuses protéines essentielles à la voie de signalisation. Il existe divers substrats qui seront clivés lors de l'apoptose: les protéines cytoplasmiques, comme l'actine, les protéines nucléaires, les protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN, les protéines kinases, les protéines engagées dans la voie de signalisation des cellules, les protéines de régulation du cycle cellulaire et de la prolifération, etc. (Earnshaw, Martins et Kaufmann, 1999).

2.2.1 Activation des caspases

L'activation des caspases peut se faire selon deux mécanismes distincts : le premier se produit par l'action d'une autre protéase, soit une caspase, tandis que le deuxième mécanisme s'exprime suite à la liaison d'une protéine adaptatrice au pro-domaine des caspases initiateuses qui vont à leur tour activer les caspases exécutrices. Qu'importe le mécanisme emprunté, ces derniers mènent à la dégradation de la cellule via deux voies principales, que nous décrirons brièvement, la voie de la mitochondrie et la voie des récepteurs de mort (DR) (Earnshaw, Martins et Kaufmann, 1999).

2.2.1.1 Voie de la mitochondrie

La voie mitochondriale est surtout employée au niveau des cellules endommagées par le stress oxydatif ou par la présence de toxiques. Le processus implique une redistribution du cytochrome c provenant de la mitochondrie vers le cytosol, suite à l'activation des caspases (Li et *al.*, 1997). Cette activation des caspases est dépendante de la présence de la molécule APAF-1. Lorsque le cytochrome c est relâché de la mitochondrie, APAF-1 se lie à la procaspase-9 de manière ATP et cytochrome c-dépendante (Li et *al.*, 1997). La molécule APAF-1 et la procaspase-9 interagissent et oligomérisent via leur domaine de recrutement des caspases (CARD) (Hofmann, Bucher et Tschopp, 1997). Ce domaine de recrutement des caspases a également été identifié au niveau des molécules adaptatrices des domaines de mort (DD). Cette interaction permet l'activation de caspase-9 qui à son tour va pouvoir activer caspase-3, enclenchant la cascade apoptotique irréversible.

2.2.1.2 Voie des récepteurs de mort

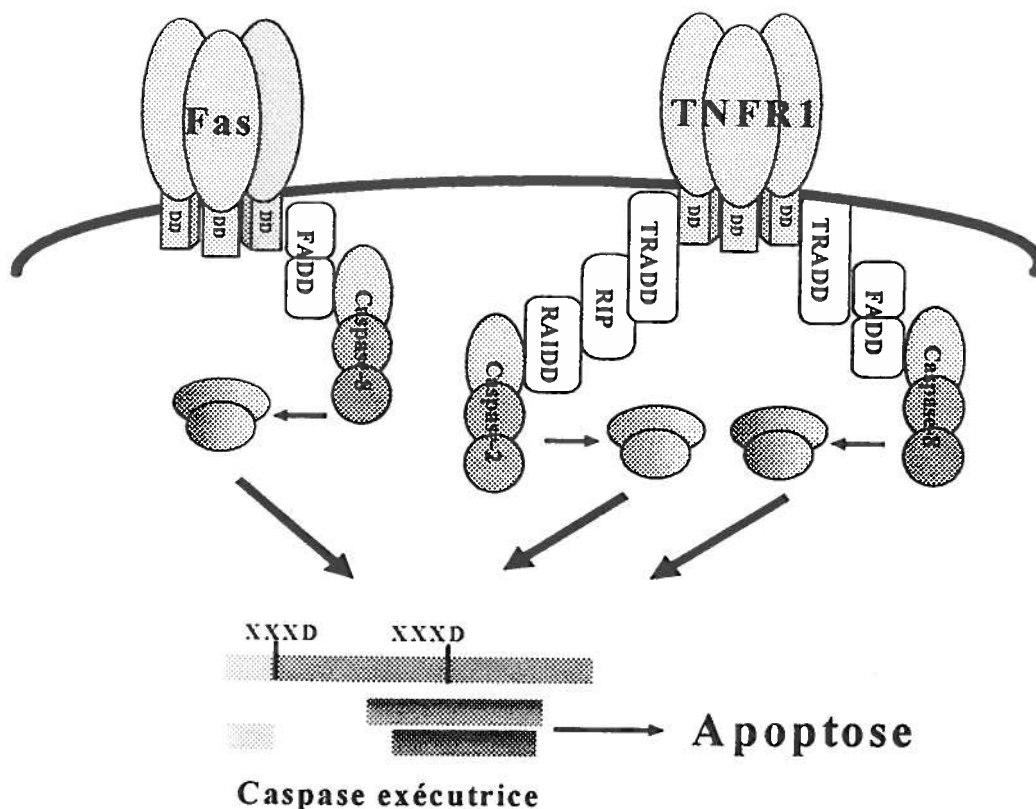


Figure 4 : Voie d'activation des caspases par les récepteurs de mort.

(Modifié de F. Denis, 2000)

Outre la voie d'activation via le relâchement du cytochrome c, les caspases peuvent être activées directement par les récepteurs de surface, les récepteurs de mort (DR), qui initieront la mort cellulaire. Cette voie d'activation de l'apoptose est surtout employée pour éliminer les cellules viables et non endommagées, entre autres pour les cellules potentiellement dangereuses, telles les cellules lymphocytaires autoréactives (Rathmell et Thompson, 1999). Les DR les mieux connus sont ceux faisant partie des membres de la famille TNFR. La famille des TNFR peut être divisée en deux groupes : ceux qui induisent la survie cellulaire et ceux qui promeuvent la mort cellulaire. Les récepteurs qui s'opposent à la mort cellulaire incluent le CD27, CD30, CD40, TNFR-II, O_x40 tandis que le CD95 (Fas/APO-1), TNFR-I, DR3, DR4 et DR5 sont des récepteurs induisant la mort cellulaire (Rathmell et Thompson, 1999). Les récepteurs de la famille TNFR possèdent des séquences d'homologie, c'est-à-dire des séquences riches en cystéines au niveau de leur domaine extracellulaire, alors que les récepteurs induisant la mort cellulaire, partagent également un domaine de 80 acides aminés appelé, domaine de mort (DD) (Itoh et Nagata, 1993). Ces DD sont essentiels à l'activation des caspases. Bien qu'ils ne possèdent aucune activité enzymatique, les DD ont plutôt comme fonction de lier des protéines adaptatrices contenant elles aussi des DD, qui activeront les caspases (Rathmell et Thompson, 1999). Le DR le plus étudié est le CD95/Fas/Apo-1. Fas induit l'apoptose chez les cellules T activées, lorsque celles-ci sont stimulées de façon répétitive, et ce DR joue également un rôle dans le maintien de la tolérance des cellules T (Parijs, Peterson et Abbas, 1998). L'interaction avec son ligand Fas-L induit la trimérisation du récepteur facilitant la liaison d'une molécule adaptatrice FADD/Mort1, suivi de l'activation de la caspase-8 ou -10 (Rathmell et Thompson, 1999). L'oligomérisation des caspases stimule leur activation et enclenche la cascade apoptotique des caspases.

2.2.2 Régulation de l'apoptose

La mort cellulaire programmée joue un rôle indispensable dans le développement et le bon maintien de l'homéostasie des cellules. Bien que l'apoptose soit initiée dans plusieurs cellules en absence d'ARNm ou de synthèse protéique, plusieurs observations portent à croire qu'il y aurait régulation au niveau de la transcription des gènes des pro-caspases. L'INF- γ est un facteur influençant l'expression des gènes des pro-caspases. L'équipe de Tamura a démontré que des cellules traitées avec de l'INF- γ étaient plus susceptibles d'entrer en apoptose par le biais d'une augmentation de l'expression des caspases (Tamura et *al.*, 1996). De plus, des cellules déficientes au niveau des deux facteurs de transcription de l'INF- γ (IRF-1 et STAT-1) exprimaient moins l'ARNm des pro-caspases-1, -2 et -3 et possédaient une capacité moindre à entrer en apoptose (Earnshaw, Martins et Kaufmann, 1999).

L'apoptose peut être également régulée par la voie des récepteurs de mort, soit par un polypeptide nommé FLIP. Ce polypeptide contient des domaines effecteurs de la mort (DED) qui ont la propriété de se lier au prodomaine des procaspases-8 et -10, inhibant ainsi le recrutement de ces caspases au niveau des DED des récepteurs CD95/Fas et TNFR-1 lors de leur activation (Irmeler et *al.*, 1997). Dans des conditions physiologiques, les cellules T traitées avec de l'IL-2 sont moins susceptibles d'entrer en apoptose par activation de Fas, puisque FLIP inhibe l'activation de la procaspase-8 (Irmeler et *al.*, 1997).

Les protéines de la famille Bcl-2 peuvent également jouer le rôle de "contrôleur intracellulaire" de l'activation des caspases et de l'apoptose, en altérant le recrutement des procaspases. Les fonctions de Bcl-2, en tant qu'oncogène, ont été élucidées par Vaux et *al.* (Vaux et *al.*, 1988) suite à la démonstration de signaux de survie chez les cellules exprimant Bcl-2. L'expression de Bcl-2 prévient la mort cellulaire et peut même protéger les cellules T contre des signaux de mort tels que, l'inhibition métabolique, l'expression d'oncogènes, les altérations de l'ADN, les traitements aux glucocorticoïdes et les radiations γ . Bcl-2 empêche également la mort cellulaire induite par le récepteur CD95 dans certaines cellules. Les régulateurs les mieux définis pour l'apoptose des lymphocytes T sont les membres de la famille de Fas et de Bcl-2 (Parijs, Peterson et Abbas, 1998). Ainsi la liaison de Fas-FasL est impliquée dans l'élimination des lymphocytes T matures ou auto-réactifs alors que les protéines de la famille Bcl-2 sont essentielles à la survie des lymphocytes en réponse à des facteurs de croissance et divers stimuli. La surexpression de Bcl-2 conduit même à l'augmentation de la viabilité de certaines cellules en absence de cytokines essentielles à la survie, telles l'IL-3, l'IL-4, GM-CSF, et dans certains cas en absence d'IL-2 (Chao et Korsmeyer, 1998). D'autres membres de la famille Bcl-2, ayant la propriété d'être des antagonistes de la mort cellulaire, ont été identifiés tels que Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 et A-1 (Rathmell et Thompson, 1999). Cependant, il existe un second groupe faisant partie de la famille des oncogènes de Bcl-2 et qui ont la propriété d'induire la mort cellulaire. Parmi ces membres pro-apoptotiques, on retrouve Bax, Bak, Bcl-x_s, Bad et autres (Rathmell et Thompson, 1999). Une caractéristique importante des membres de la famille de Bcl-2 repose sur leur capacité de former des homodimères et des hétérodimères (Chao et Korsmeyer, 1998). Ainsi, Bcl-2 et Bcl-X_L se retrouvant de façon prédominante dans la membrane externe de la mitochondrie, peuvent former des hétérodimères avec les membres de la famille des pro-apoptotiques, les empêchant de stimuler le relâchement du cytochrome c (Chao et Korsmeyer, 1998). De plus, Bcl-X_L inhibe la formation du complexe APAF-1/caspase-9 et l'activation subséquente des zymogènes lors du processus de mort cellulaire programmée (Hu et *al.*, 1998).

Outre la régulation par les membres de la famille Bcl-2, les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) peuvent également réguler l'activation de l'apoptose. Jusqu'à présent 5 homologues de la protéine IAP du virus baculovirus, ont été identifiés chez les mammifères, dont cIAP, cIAP-2, XIAP et NAIP (Earnshaw, Martins et Kaufmann, 1999). Ainsi cIAP, cIAP-2 et XIAP peuvent se lier et inhiber les caspases-3 et -7 actives et peuvent également prévenir l'activation de la pro-caspase-9 après liaison (Earnshaw, Martins et Kaufmann, 1999). Les protéines cIAP-1 et sIAP-2 peuvent lier les polypeptides TRAF-1 et TRAF-2 associés au récepteur TNFR1. De plus, cIAP-1, cIAP-2 et XIAP ont été identifiés comme des protéines contribuant à la protection de certaines cellules exposées à TNF- α par le biais du facteur de transcription NF κ B (Deveraux, *et al.*, 1997; Roy *et al.*, 1997).

Certaines caspases activées semblent être régulées par des modifications post-traductionnelles. L'oxyde nitrique (NO) inhibe les caspases actives par la nitrosation des résidus cystéine localisés au site actif (Kim, Talanian et Billiar, 1997). Cependant, plusieurs études ont démontré que la présence de concentrations élevées de NO induisait fortement les cellules à entrer en apoptose. Diverses études suggèrent que l'apoptose serait régulée par des protéines kinases ou des phosphatases, par phosphorylation des caspases actives affectant leur activité enzymatique. La phosphorylation ou la déphosphorylation des domaines des membres de Bcl-2, permettrait de réguler l'induction de la voie apoptotique ou la survie cellulaire (Earnshaw, Martins et Kaufmann, 1999).

2.3. Anergie

L'anergie est un état cellulaire durant lequel les lymphocytes sont viables mais incapables de déclencher une réponse immunitaire fonctionnelle ayant lieu lorsqu'il y a stimulation appropriée du TcR et des autres récepteurs essentiels à l'activation. Le terme « anergie » a été initialement employé par Nossal et Pike, afin de décrire un état de non-réponse induit suite à l'injection de protéines antigéniques solubles à un animal, provoquant ainsi la synthèse de lymphocytes B non-activables caractérisés par l'absence de production d'Ig (Nossal et Pike, 1980). Durant le développement des thymocytes, les cellules T exprimant un TcR spécifique au soi sont éliminées ou encore sont rendues anergiques (Goldsby, Kindt et Osborne, 2000). Des expériences antérieures *in vivo* ont suggéré que l'anergie clonale était un processus essentiel au maintien de la tolérance périphérique aux Ag du soi, qui ne sont pas exprimés dans le thymus lors du développement des thymocytes, ou à la maintenance des cellules T ayant échappées à l'élimination dans le thymus (DeSilva, Urdahl et Jenkins, 1991). La reconnaissance d'un complexe peptide antigénique-CMH à la surface d'une CPA par une cellule T se

traduit soit par une activation suivie d'une expansion clonale, soit par un état de non-réponse appelé **anergie clonale**.

2.3.1 Causes principales d'anergie chez les lymphocytes T

L'anergie est un état d'inactivation marqué par l'incapacité des cellules à proliférer en réponse à un stimulus. Cet état d'inactivation des lymphocytes T a fait l'objet de diverses études afin d'élucider les causes et les conséquences de cette anergie. L'anergie a été décrite par Schwartz et ses collègues, à partir d'un modèle *in vitro*, où des clones de cellules T ont été rendus anergiques après présentation de l'antigène en absence des signaux appropriés de co-stimulation (Jenkins et Schwartz, 1987). Même après une seconde stimulation avec des CPA dites professionnelles, c'est-à-dire exprimant des molécules de CMH-peptide et de co-stimulation, les cellules anergiques ne pouvaient proliférer (Schwartz, 1996). Ainsi, Schwartz et ses collègues ont mis sur pied un modèle *in vitro* pouvant apporter des explications au phénomène de l'anergie. Des cellules CD4 de clones murins mis en culture avec des CPA professionnelles, proliféraient et synthétisaient de l'IL-2. Alors qu'après stimulation antigénique avec des CPA exprimant des molécules de CMH seules en absence de molécules de co-stimulation, ces clones murins étaient incapables de synthétiser de l'IL-2. Deux hypothèses émanent de cette étude, soit que la présence de molécules de co-stimulation est essentielle à la synthèse d'IL-2 ou tout simplement que les cellules T ne répondent plus à l'IL-2 en absence de celles-ci (Powell et al., 1998). Par la suite, certaines études ont voulu démontrer cet état d'anergie *in vivo* (Lenschow et al., 1992). Un groupe de recherche a donc observé ce phénomène d'anergie suite à des injections de fortes concentrations d'INF- γ (DeSilva, Urdahl et Jenkins, 1991). En réponse à des doses élevées d'INF- γ , les cellules épithéliales expriment les molécules Ia leur permettant de présenter l'Ag aux cellules CD4⁺, en absence de molécules de co-stimulation (DeSilva, Urdahl et Jenkins, 1991). Ils ont également observé que les cellules T étaient dans un état de non-réponse lorsque celles-ci étaient exposées, de façon chronique, à des doses élevées d'Ag; phénomène s'illustrant par une inhibition de la prolifération des cellules T en réponse à un superantigène.

Quill et Schwartz ont par la suite découvert que l'induction d'anergie pouvait être bloquée par ajout de cycloheximide et/ou de cyclosporine, portant à croire que le maintien de l'anergie impliquerait la synthèse de novo de protéines ainsi que l'activité de la calcineurine (Quill et Schwartz, 1987). Deux hypothèses viennent appuyer l'idée que l'induction d'anergie serait en partie la conséquence d'une activation subséquente des "protéines de l'anergie". La première hypothèse découle du fait que lors de l'activation des lymphocytes T, l'interaction entre la cytokine IL-2 et son récepteur IL-2R, ainsi que la

division cellulaire des cellules activées auraient pour conséquence de prévenir l'apparition des "protéines de l'anergie". (DeSilva, Urdahl et Jenkins, 1991). Ce concept est plausible, puisque l'état d'anergie des cellules T peut être renversé par l'addition d'IL-2 exogène. La seconde hypothèse est que la présence des molécules de co-stimulation, qui sont reconnues par leur ligand B7, bloquerait l'apparition des inhibiteurs moléculaires essentiels à l'induction de l'anergie. Des expérimentations faites à partir de clones humains, ont permis d'observer que l'engagement de la molécule B7 avec son ligand CD28 bloquait l'augmentation de la production de Nil-2a, stimulée par l'engagement du TcR seul lors de l'activation des cellules T (Becker et al, 1996). Le facteur de transcription Nil-2a a la capacité de se lier aux éléments de régulation négative (NRE), présents au niveau du promoteur du gène de l'IL-2, bloquant ainsi l'initiation de la transcription de l'IL-2 (Williams et al., 1991). Outre l'altération de la transcription du gène de la cytokine IL-2, les cellules rendues anergiques *in vivo* suite à des expositions à un superantigène, semblent être également affectées au niveau de la voie du Ca^{2+} /calcineurine (Kimura et al., 2000). Par une défectuosité de l'activation de PLC- γ 1, il y aurait altération du Ca^{2+} intracellulaire chez les cellules anergiques.

Des études analysant les événements biochimiques des cellules T anergiques, ont démontré que cet état de non réponse était associé à des niveaux élevés de Ca^{2+} intracellulaire (Jenkins et al., 1987). Traiter les cellules T avec des ionophores, tel que l'ionomycine, avait pour effet d'augmenter la concentration de Ca^{2+} intracellulaire, induisant cet état d'inactivation (Jenkins et al., 1987). D'autres événements biochimiques et moléculaires ont été observés chez les cellules anergiques, tels une altération de la phosphorylation des tyrosines au niveau des protéines intracellulaires, une activité déficiente de Ras lors de la signalisation ainsi qu'une altération de l'activité d'AP-1 (Kang et al., 1992). La production d'IL-2 par les cellules T est fortement régulée au niveau transcriptionnel, comme nous l'avons décrit précédemment. L'engagement de la molécule B7 avec son ligand CD28 enclenche une phosphorylation des résidus de tyrosines présents sur la queue intracytoplasmique de la chaîne ζ du CD3, suivie d'une activation des MAP-kinases enclenchant l'activation du gène de l'IL-2. Cette activation requiert l'interaction de plusieurs facteurs de transcription, incluant AP-1, NF- κ B, NF-AT et NF-IL-2. AP-1 joue un rôle important dans la régulation du promoteur de l'IL-2 et participe également dans la formation de la forme active de NF-AT et de NF-IL-2. Le facteur de transcription AP-1 est un complexe formé de différents membres de la protéine Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 et Fra-2) et de la protéine Jun (c-Jun, JunB et JunD), étant eux-mêmes régulés par la voie des MAP-kinases, ERK, JNK et FRK. De plus, l'activation de ERK est dépendante de l'association du complexe TcR-CD3 à la protéine p21^{Ras} ainsi que de l'activation subséquente de la cascade des Raf-MEK kinases. L'activation de JNK est elle aussi dépendante de la protéine p21^{Ras} et de la présence de

la molécule de co-stimulation CD28 (Sundstedt et Dohlsten, 1998). Une étude récente faite à partir de cellules T anergiques, suggère que l'altération de la transcription de l'IL-2 est la conséquence d'une mauvaise activation de la protéine p21^{Ras}, ayant pour conséquence d'altérer la cascade de signalisation intracellulaire des MAP-kinases incluant ERK et JNK (Li et *al.*, 1996). Ces dernières modifications altèrent également l'activation du facteur de transcription AP-1, suite à l'engagement du TcR seul (Kang, 1992). Puisque la phosphorylation de Shc et de Grb2 semble être normale chez les cellules T anergiques, ce serait plutôt au niveau de la conversion de GDP-Ras en sa forme active GTP-Ras qui serait inhibée, engendrant une activation déficiente de la protéine p21^{Ras} (Fields, Gajewski et Fitch, 1996). Boussiotis et ses collègues ont démontré un mécanisme additionnel expliquant la diminution de l'activation de ERK chez les cellules anergiques. Ils ont noté une augmentation de l'activité de Rap-1, facteur qui bloquerait la voie des MAP-kinases en se liant à Raf-1, inhibant son activité (Boussiotis et *al.*, 1997). Sundstedt et Dohlsten ont également démontré que les cellules T rendues anergiques *in vivo* en réponse à un superantigène, contenaient des altérations au niveau de la signalisation d'AP-1, expliquant l'incapacité des cellules anergiques à induire l'activité de JNK kinase pour ensuite synthétiser de l'IL-2 (Sundstedt et Dohlsten, 1998). Comme la voie des Ras/MAP kinases ainsi que la voie du Ca²⁺/calcineurine sont nécessaires à la transcription et la synthèse de l'IL-2, ces dernières seraient impliquées dans l'induction de l'état d'anergie des cellules T.

L'IL-2 n'est pas la seule cytokine à être produite à des niveaux moindres chez les cellules anergiques. Par exemple, la synthèse de l'IL-3/GM-CSF est également diminuée et l'état d'anergie empêche également les cellules T à produire de l'IL-4 et de l'IL-12 (Mueller et *al.*, 1991; Quill et *al.*, 1994). Les cellules T CD4⁺ anergiques sont incapables d'activer les cellules B puisque ces dernières n'expriment pas le ligand CD40 (Bowen, Haluskey et Quill, 1995; Telander et Mueller, 1997). Alors que les cellules T CD4 anergiques perdent leur activité effectrice, les cellules CD8⁺ anergiques semblent cependant garder leurs fonctions cytotoxiques (Otten et Germain, 1991).

La présence d'IL-10 dans l'environnement jouerait un rôle dans l'induction d'anergie des cellules T. L'IL-10 bloquerait les signaux de co-stimulation lors de la présentation antigénique, surtout au niveau des macrophages (Ding et Shevach, 1992; Ding et *al.*, 1993). Cette cytokine convertirait les macrophages activés en monocytes-dormants, caractérisés par une baisse de production des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-12 et le TNF- α , ainsi qu'une baisse d'expression des molécules de co-stimulation (Ding et *al.*, 1993). L'anergie des cellules T peut être également induite par la présence de ligands peptidiques altérés (APL) présentés par les CPA professionnelles (Korb et *al.*, 1999). Les APL ont permis de comprendre les événements moléculaires qui surviennent lors de la

transmission du signal 1 via le TcR. Les APL sont similaires aux peptides agonistes, qui engendrent une activation complète des cellules T, à l'exception généralement de quelques acides aminés. Ces acides aminés échangés sont ceux étant en contact avec le TcR et fonctionnent en tant qu'antagonistes ou agonistes partiels. Des ligands antagonistes inhibent toute activation des cellules T alors que les ligands agonistes partiels peuvent activer certaines fonctions effectrices des cellules T. Plusieurs groupes de recherche ont démontré que la reconnaissance de ces ligands antagonistes ou agonistes partiels induisait un état d'anergie chez les cellules T, puisqu'ils transmettaient un signal négatif, induisant une mauvaise conformation du TcR (Sloan-Lancaster et *al.*, 1993 ; Korb et *al.*, 1999). Le mécanisme responsable de cet état d'anergie reste encore inexpliqué mais il inclurait l'avidité de l'interaction TcR-APC. De plus, il semble que certaines cellules T, après être activées, peuvent exprimer un CMH de classe II à leur surface et ainsi présenter un antigène à une autre cellule T. Ainsi lorsqu'il y a présentation d'antigène d'une cellule T à une autre cellule T par son CMH de classe II, il y a induction d'anergie puisque les cellules T n'expriment pas de molécules de co-stimulation. (présentation cellules T à cellules T) (Taams et *al.*, 1998). De plus, certains pensent que l'état d'anergie ne se définit pas comme un état de non-réponse versus un état de réponse. Il existerait de multiples niveaux d'anergie selon le mécanisme d'induction ou encore en fonction de la dose d'Ag (Taams, Eden, Wauben, 1999). L'état de non réponse n'est pas seulement enclenché suite à des doses élevées d'Ag (ex. superantigène), mais peut avoir lieu en présence de dose optimale d'Ag ou suboptimale, engendrant divers niveaux d'anergie. Cette variation pourrait contribuer de façon passive ou active à la régulation de la réponse immunitaire (Taams, Eden, Wauben, 1999). En résumé, les mécanismes responsables de l'état d'anergie sont encore énigmatiques mais leur présence permet une certaine régulation du système immunitaire, tant sa nature positive ou négative.

CHAPITRE 3

BRÛLURES SÉVÈRES ET LE SYSTÈME IMMUNITAIRE

3.1 Effets d'une brûlure sévère

Bien qu'il existe plusieurs types de brûlures, tels que les brûlures électriques, chimiques ou par irradiations, nous nous attarderons dans ce cas-ci aux effets découlant d'une brûlure thermique. Les brûlures sévères constituent une des causes majeures de mortalité ainsi que de morbidité à travers le monde. Parmi les patients ayant préalablement survécu aux dommages physiques d'une brûlure sévère, 80% de ces derniers meurent suite à diverses complications résultant directement de perturbations et d'anomalies de divers organes ou systèmes, engendrant un choc septique (O'Sullivan et O'Connor, 1997). Les brûlures sévères sont sûrement un des seuls traumatismes à affecté de multiples systèmes chez un organisme.

3.1.1 Altération de divers systèmes

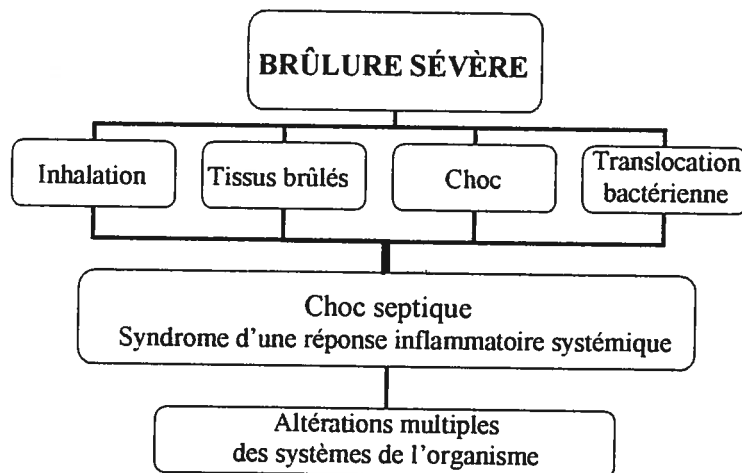


Figure 5: Effets découlant d'une brûlure sévère

Parmi les états post-traumatiques, les brûlures sévères sont celles qui entraînent les plus grandes perturbations métaboliques provoquées par la libération de médiateurs inflammatoires ainsi que le développement anormal du milieu hormonal en réponse au stress (Demling et Seigne, 2000). Une augmentation de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-8, ainsi qu'une augmentation de l'activité oxydante provoquent une augmentation remarquable de la

dégradation protéique (Demling et Seigne, 2000). Certaines études ont également montré une augmentation du relâchement d'hormones cataboliques endogènes, telles que le cortisol et les catécholamines, et une diminution de l'activité endogène d'agents anabolisants (ex. : hormone de croissance humaine et la testostérone), le tout contribuant à une perte significative de protéines (Demling et Seigne, 2000). Suivant une brûlure sévère, la libération des protéines musculaires est accélérée et une augmentation du métabolisme des protéines est observée au niveau du foie, afin de libérer des acides aminés essentiels à la réparation des tissus (Wolfe, 1981). L'amplitude du processus catabolique des muscles est si prononcée qu'on voit une baisse massive de la masse corporelle chez les patients gravement brûlés. Quelques groupes de recherche ont étudié les propriétés de certains acides aminés suivant le traumatisme de la brûlure, dont la glutamine. L'administration de glutamine, l'acide aminé le plus abondant dans le sang, avait pour conséquence d'augmenter le taux de rémission des grands brûlés (Papaconstantinou et *al.*, 1998; Bernier et *al.*, 2003). Le métabolisme du glucose est également altéré suite à une brûlure grave (Wolfe et *al.*, 1979). Ainsi, suite au traumatisme, il y a une augmentation de la production de glucose enclenchée par (1) une perte de l'action inhibitrice du glucose exogène sur la production endogène de celui-ci ou encore par (2) une diminution de l'efficacité de l'insuline ou de la prise périphérique du glucose. Ces diverses perturbations métaboliques sont la conséquence d'une augmentation du glycogène ayant pour effet d'induire (1) de l'hyperglycémie, (2) une augmentation du dépôt de gras, (3) une augmentation du catabolisme et (4) une perte d'énergie excessive (Demling et Seigne, 2000). Comme toute forme de stress, la brûlure sévère induit également une augmentation de la lipolyse, processus résultant d'une dégradation des acides aminés et de leur libération dans le sang (Demling et Seigne, 2000). Les acides gras s'incorporent rapidement dans la membrane lipidique de diverses cellules, incluant les cellules immunitaires, ayant pour conséquence d'inhiber la prolifération des lymphocytes et la production de cytokines, d'où l'importance d'une diète faible en lipides pour les patients brûlés (Jobin, Garrel, Bernier, 2000).

Vers 1979, Berg et Garlington ont introduit le terme de translocation bactérienne, signifiant le passage de bactéries entériques viables du tractus gastro-intestinal vers les ganglions mésentériques (Berg et Garlington, 1979). Ce processus peut être en partie un facteur prédisposant à des infections systémiques et à un état d'hypermétabolisme dégénérant vers un choc septique (Alexander et *al.*, 1991). Il a été observé de 7 à 12 heures suivant une brûlure sévère, une augmentation d'endotoxines circulantes d'origine intestinale. (Cuevas et *al.*, 1974; Deitch, Winterton, Berg, 1986; Deitch et Berg, 1987). Cette translocation bactérienne se définit par une perte de perméabilité provoquant le passage de bactéries entériques viables du lumen du tractus gastro-intestinal vers d'autres organes, via le

système lymphatique mésentérique (Epstein, Banducci et Manders, 1992). Dans des conditions normales, la muqueuse du tractus gastro-intestinal est imperméable à la flore endogène non-pathogène. Cependant, les mécanismes responsables de cette augmentation de la translocation bactérienne demeurent encore inconnus. Plusieurs études suggèrent que les perturbations du système immunitaire sont à l'origine d'une augmentation de la translocation bactérienne, suite à une perte de la perméabilité du tractus gastro-intestinal (Deitch, Winterton et Berg, 1986; Epstein et *al.*, 1992, Baron et *al.*, 1994). Cependant, il a été clairement établi que la microflore indigène du tractus gastro-intestinal est une source importante d'infections chez les patients dont le système immunitaire est affaibli, tels les patients ayant un cancer, par exemple la leucémie, et qui subissent des traitements de chimiothérapie (Cesario et *al.*, 1978; Keating, Rodriguez et Bodey, 1977). De plus, il a été démontré que l'accroissement de LPS, observé lors d'une réponse inflammatoire, augmentait la perméabilité de l'épithélium intestinal. Une interprétation possible serait que la présence de LPS induirait une ischémie du mésentère (Baron et *al.*, 1994). Il n'en demeure pas moins que cette translocation bactérienne du mésentère a pour conséquence d'induire une augmentation d'endotoxines dans l'organisme, activant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires pouvant initier le syndrome d'une réponse inflammatoire systémique (SRIS). Fukushima et ses collègues ont démontré que l'intensité de la translocation bactérienne était hautement associée à la brûlure et à la durée de survie suite au traumatisme (Fukushima et *al.*, 1992). Étonnamment la durée de survie était de beaucoup supérieure lorsqu'il y avait administration d'analogues de la PGE, ce qui avait pour effet d'augmenter les fonctions de la barrière intestinale.

3.1.2 Altération du système immunitaire

Les brûlures sévères induisent également d'importantes altérations au niveau des fonctions du système immunitaire, ce qui résulte en un état d'immunosuppression (Faist, Schinkel et Zimmer, 1996; Barlow, 1994). Dès le début des années 60, diverses équipes de recherche se sont intéressées au phénomène de la brûlure sévère et à ses conséquences sur le système immunitaire. Dès lors, il a été noté que les patients gravement brûlés étaient plus susceptibles aux infections secondaires (Liedberg, 1961; McRipley et Garrison, 1963). Par une méthode de titrage des bactéries, il a également été observé une augmentation de bactéries, soit *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, colonisant les plaies des patients brûlés. (Jones et Lowbury, 1963). Malgré que peu d'études aient été effectuées sur la capacité de l'organisme à synthétiser des anticorps spécifiques à ces bactéries colonisantes, certains travaux réalisés à partir de modèles animaux, ont démontré une activation du système immunitaire prévenant ainsi l'invasion progressive de ces bactéries au niveau des plaies (Alexander, Moncrief,

1966). Parmi les premières recherches faites à partir d'un modèle murin, une corrélation a été clairement établie entre le degré d'une brûlure infligée aux animaux et l'inhibition du système immunitaire à induire une réponse primaire après stimulation mitogénique (Alexander et Moncrief, 1966). Cette dernière étude a également démontré que le degré d'inhibition de l'immunité dépendait du facteur temporel, c'est-à-dire le moment où on injectait l'Ag suite au traumatisme de la brûlure (Alexander et Moncrief, 1966). Les perturbations multiples du système immunitaire, suite à une brûlure sévère, ont été longuement étudiées et sont encore la cible de diverses recherches. Les résultats émanant de ces nombreuses investigations sont difficiles d'interprétation puisque les brûlures sévères altèrent non seulement une cellule en particulier ou une seule fonction du système immunitaire, mais portent sur l'ensemble des fonctions de l'immunité. Par contre, tous s'entendent sur le fait que les altérations majeures observées au niveau de l'immunité, ont pour conséquence d'augmenter la susceptibilité de l'organisme à diverses infections secondaires et donner lieu éventuellement à une septicémie. C'est pour cette raison que les grands brûlés sont les patients qui présentent le moins de cas de rejet de greffe, sur une période donnée, dû à leur faiblesse du système immunitaire (Ninneman, Fisher et Frank, 1978). Malgré les avancements remarquables sur l'approche clinique des grands brûlés, il n'en demeure pas moins qu'encore aujourd'hui les infections locales et systémiques sont les causes majeures de morbidité et de mortalité.

3.1.2.1 Altération de la réponse non-spécifique

Les effets néfastes découlant d'une brûlure sévère englobent l'ensemble des fonctions du système immunitaire, soit l'immunité non-spécifique et l'immunité spécifique. Les LPS, activement relâchés au niveau des sites d'inflammation suivant le traumatisme d'une brûlure, agissent comme des activateurs potentiels de la voie alternative du complément (Boer et *al.*, 1992). L'activation du complément se résume par une production des médiateurs pro-inflammatoires C4a, C3a et C5a, ce dernier étant le médiateur le plus puissant (Haeney, 1998). Le composé C5a a pour effet d'attirer les neutrophiles, étant parmi les premiers effecteurs de l'immunité non-spécifique à être interpellés après un traumatisme quelconque, tel que la brûlure. Essentiellement, toutes interactions entre les neutrophiles et son environnement se feront via des récepteurs de surface. Cette forme de médiation permet donc un degré de spécificité des neutrophiles vis-à-vis un stimulus. Plusieurs études ont noté suite au traumatisme par la brûlure, une perte de chimiotaxie des neutrophiles découlant d'une diminution à répondre au composé C5a et ses métabolites (Nelson et *al.*, 1987). Lorsque les neutrophiles sont exposés à des concentrations élevées de C5a, concentrations hautement supérieures à

celles nécessaires pour la chimotaxie seule, il a été observé une inhibition du récepteur de surface pour le composé C5a. Suite à une réponse inflammatoire excessive, il y a une production massive du composé C5a, causant une perte de l'expression du récepteur de surface des neutrophiles d'où une diminution de la migration de ces derniers (Nelson *et al.*, 1987). Cependant, certaines études ont démontré qu'il existait une expression minimale du récepteur de surface spécifique au C5a, permettant aux neutrophiles une chimotaxie minimale (Moore *et al.*, 1986). À noter que cette réduction de neutrophiles aux sites d'inflammation pourrait jouer un effet protecteur, puisque l'absence de ces derniers aurait pour effet de diminuer le relâchement d'enzymes ou de dérivés oxydatifs. Suite au traumatisme par la brûlure, les interactions entre les neutrophiles circulants et les composés C5a permettent aux neutrophiles d'adhérer aux cellules endothéliales dans le but subséquent de rencontrer des protéines du tissu conjonctif et de phagocyter des particules, processus enclenchant une réponse immunitaire. (Charo *et al.*, 1986; Lo *et al.*, 1989). L'activation des neutrophiles par des peptides physiologiques, par le relâchement d'endotoxines ou encore par la présence de TNF- α produit par les macrophages, résulte d'une augmentation de l'expression du récepteur FMLP, du récepteur à phagocytose C3, des molécules d'adhésion CD11/CD18, ainsi que des récepteurs à vitronectine, à laminine et à fibronectine (Arnaout, 1990; Solomkin *et al.*, 1984). L'augmentation de l'expression de ces récepteurs permet aux neutrophiles activés d'adhérer aux tissus et de phagocyter. Des essais de phagocytose ont démontré qu'il y avait une augmentation de l'activité phagocytaire des neutrophiles dans les 10 jours suivant la brûlure (Bjerknes, Vindenes et Laerum, 1990). Des études antérieures ont également noté une augmentation du relâchement de O_2 par les neutrophiles circulants chez les patients gravement brûlés. Le relâchement de O_2 permet l'initiation de la formation des métabolites toxiques d'oxygène réactif, processus essentiel dans l'élimination de pathogènes lors d'une réponse inflammatoire (Solomkin *et al.*, 1990).

Outre les neutrophiles, le composé C5a est également un excellent chémoattractant pour les macrophages, effecteurs de l'immunité non-spécifique. Suite au traumatisme de la brûlure, Santangelo et son équipe ont noté une augmentation de monocytes/macrophages dans les tissus endommagés et en périphérie, corrélant avec une granulocytopenie (Santangelo *et al.*, 2001). Les cellules hématopoïétiques myéloïdes se différencient majoritairement en monocytes au dépend des granulocytes. Cette expansion de monocytes était précédée par une augmentation du facteur M-CSF plasmatique, contribuant ainsi à cette hausse d'accessibilité des monocytes/macrophages pour une activation subséquente (Wallner *et al.*, 1984). Outre une élévation du facteur M-CSF, Wallner et coll. ont également observé suite au traumatisme de la brûlure, une augmentation de l'expression du récepteur au facteur M-CSF chez les cellules souches. Lors d'un traumatisme l'activation des

macrophages aux sites d'inflammation permettrait l'initiation de la synthèse des leucotriènes et des facteurs d'activation des plaquettes, et augmenterait l'adhérence des leucocytes. Il y aurait également hausse de la présentation antigénique induisant la sécrétion de composés chémoattractants et favorisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1, l'IL-6, le TNF- α , l'INF- α et l'INF- β (O'Sullivan et O'Connor, 1997). Les macrophages activés aux sites d'inflammation relâcheraient une variété de molécules affectant les interactions entre les neutrophiles et les cellules endothéliales, et induisant la chimotaxie des neutrophiles par la production d'IL-8 et de LTB₄ (O'Sullivan et O'Connor, 1997).

Cependant, suite à une brûlure sévère les fonctions effectrices des macrophages sont quelque peu altérées, étant probablement la conséquence d'une augmentation des niveaux de prostaglandines E₂ (PGE₂) (O'Sullivan et O'Connor, 1997). Lorsque les macrophages sont activés *in vitro* par les LPS, ces derniers commencent à exprimer des taux élevés de NO-synthétase (NOS), enzyme qui oxyde la L-arginine en L-citrulline et NO (Goldsby, Kindt et Osborne, 2000). Cette synthèse accrue de NO a également été détectée *in vivo* suite à l'analyse des niveaux de nitrite/nitrate dans le plasma de patients gravement brûlés (Gamelli et *al.*, 1995; Preiser et *al.*, 1996). L'état d'immunosuppression suivant une brûlure est en partie la conséquence d'une augmentation d'expression de NO, via l'activation de la forme inducible de iNOS par les macrophages. (Schwacha et *al.*, 1998; Schwacha et Somers, 1998) Puisqu'au moment même où l'activité de iNOS des macrophages est haussée au 4^e et 10^e jour post-trauma, il a été démontré une suppression de la prolifération des cellules T (Masson et *al.*, 1998). Des études ont clairement identifié l'effet suppressif de NO, puisqu'en présence de l'inhibiteur de NOS, soit le N-monométhyl-L-arginine, la capacité à proliférer des lymphocytes T du groupe brûlé était comparable à celle chez le groupe contrôle (Bamberger et *al.*, 1992). La présence de NO induit une activité cytotoxique chez les cellules cibles via l'inhibition de l'activité réductase des ribonucléotides, de l'activité mitochondriale et via l'induction d'apoptose (Schwacha et Chaudry, 2002). Cette induction de l'activité de iNOS semble être INF- γ -dépendante, puisqu'en présence d'anticorps anti-INF- γ il y avait rétablissement de la prolifération des cellules T et diminution de production de NO par les macrophages (Schwacha et Somers, 1998). Suite au traumatisme, on a également remarqué une augmentation de la production d'IL-1, de TNF- α et de PGE₂ par les macrophages, médiateurs pro-inflammatoires induisant l'activité de iNOS (Schwacha et Chaudry, 2002). Les macrophages peuvent ainsi supprimer les fonctions des lymphocytes T via deux agents immunosuppresseurs : le NO et le PGE₂ (Figure 6).

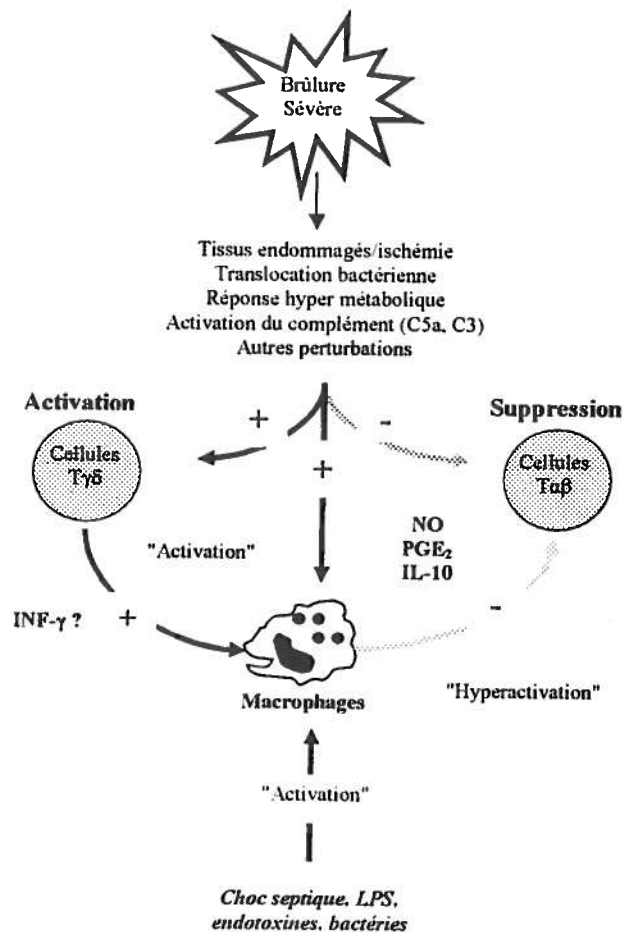


Figure 6: Schématisation du rôle des macrophages dans l'état d'immunosuppression suite au traumatisme de la brûlure.

(Modifié de Schwacha et Chaudry, 2002)

Suite à la brûlure, il a également été noté une augmentation de PGE $_2$ au niveau plasmatique (Miller-Graziano et *al.*, 1988). Les PGE $_2$ sont synthétisées à partir de l'acide arachidonique par l'enzyme COX-1, enzyme exprimé de façon constitutive, et de l'enzyme inducible COX-2 (figure 7). La biodisponibilité de l'acide arachidonique (AA), elle-même régulée par les phospholipides et l'activité de la phospholipase A $_2$ (PLA $_2$), régule la production de prostaglandines (PG) dans plusieurs populations cellulaires (Goldsby, Kindt et Osborne, 2000). Une fois synthétisées, les PGE $_2$ peuvent induire de multiples effets sur différents types cellulaires et même dans une même cellule via l'interaction avec une des 4 classes de récepteurs spécifiques (EP1 à EP4) (Strong et *al.*, 2001).

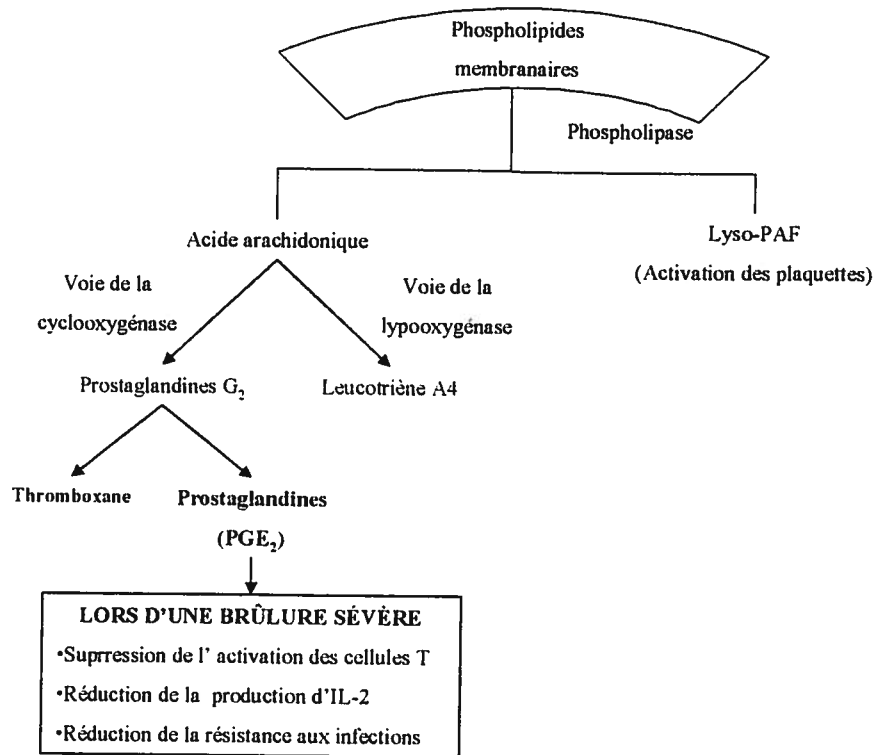


Figure 7 : Génération de prostaglandines par clivage des phospholipides membranaires.
(Modifiée de Goldsby, Kindt et Osborne, 2000)

Suivant une brûlure sévère il y a initiation d'une cascade de médiateurs inflammatoires et anti-inflammatoires régulant l'activité de COX-2 et son expression génique (Hahn et *al.*, 1999). La présence de LPS, dont les concentrations sont élevées après une brûlure, induit l'expression de COX-2 et par conséquent augmente la production de PGE₂ par les monocytes et les macrophages (Ogle et *al.*, 1994). La présence de LPS bactériens provoque également la production aberrante de TNF- α , d'IL-1 et d'IL-6 par les macrophages activés, qui à leur tour favorisent la formation de la PGE₂ par les macrophages et les fibroblastes (Hahn et Gamelli, 2000). Ces cytokines favorisent également l'expression du gène et de l'activité de COX-2. Il a été démontré que l'IL-1 et le TNF- α augmentaient l'expression de PLA₂ favorisant ainsi la synthèse de la PGE₂. À noter que les concentrations élevées de PGE₂ ne sont simplement pas dues à une augmentation de sa synthèse via une hausse de la régulation de COX-2. Cette production aberrante est également influencée par une diminution de la clairance et de la dégradation de PGE₂, suite à une suppression de l'activité enzymatique de la 15-OH déhydrogénase prostaglandine (PGDH); l'enzyme responsable de la dégradation de la PGE₂ (Hahn et *al.*, 1999).

Les PGE₂ sont de puissants immunosuppresseurs capables de moduler les fonctions des lymphocytes T, des macrophages et des granulocytes (Schwacha et Chaudry, 2002). Il a été noté que la présence de PGE₂ avait pour effet d'inhiber l'expression et l'activité de iNOS suite à une stimulation aux LPS, permettant ainsi un contrôle au niveau de l'hyperactivité des macrophages (Marotta, Sautebin et Di Rosa, 1992). Cependant, l'effet suppresseur des PGE₂ sur l'activité de iNOS est fortement réduit suite au traumatisme d'une brûlure sévère, d'où l'augmentation de réactifs intermédiaires de l'azote (RNI) (Schawacha et *al.*, 1998). La brûlure atténue donc les effets suppresseurs des PGE₂ sur les macrophages et ceci a pour conséquence d'induire un état d'hyperactivation des macrophages (Schwacha et Chaudry, 2002). Il a également été prouvé que la surproduction des PGE₂ par les macrophages suite au traumatisme, atténuait la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que la TNF- α , produites également par les macrophages stimulés aux LPS (Dong et *al.*, 1993). Certains groupes de recherche ont montré que l'abondance des PGE₂ contribuait au phénomène de neutropénie, causé par une diminution prononcée de la production de granulocytes à partir des cellules hématopoïétiques (Gamelli, Herbert et Foster, 1985; Shoup et *al.*, 1998).

La capacité de présentation antigénique par les macrophages est grandement affectée suite au traumatisme de la brûlure. En absence d'une présentation antigénique réussie, c'est l'immunité spécifique qui en sera affectée. Les mécanismes responsables d'une mauvaise présentation antigénique par les CPA ne sont pas encore élucidés. Grbic et ses collaborateurs ont démontré que les fortes concentrations des PGE₂ supprimaient l'expression de la molécule CMH de classe II, affectant la présentation antigénique des macrophages aux cellules T CD4⁺ (Grbic et *al.*, 1991). De plus, il a été observé que la présence de niveaux élevés de corticostérone endogène après la brûlure, inhibait l'expression du CMH de classe II sur les macrophages et la production d'IL-1 (Snyder, Unanue, 1982). À noter que des niveaux appropriés d'IL-1 sont favorables lors de la présentation antigénique et au niveau de l'interaction CPA/lymphocytes T (Kupper et *al.*, 1985).

Outre une production massive des PGE₂ et de NO, les macrophages synthétisent également des cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10 (Schwacha et Chaudry, 2002). Cette cytokine a la capacité de supprimer l'expression de iNOS et la production de TNF- α chez les macrophages. De plus, l'IL-10 peut inhiber l'expression de COX-2 au niveau des macrophages et des neutrophiles, diminuant ainsi la synthèse des PGE₂ lors d'une réponse inflammatoire (Schwacha et Chaudry, 2002). Cependant, suite à une brûlure, Schwacha et ses collègues ont constaté que les macrophages étaient résistants à l'effet suppressif de l'IL-10, augmentant l'hyperactivité des macrophages (Schwacha, Schneider et Chaudry, 2002). Cette diminution à répondre à la cytokine IL-10, serait en partie due à

une baisse de l'expression du récepteur de l'IL-10 à la surface des macrophages. Quelles que soient les altérations apportées au niveau des macrophages/monocytes ou des neutrophiles, ces dernières ont des répercussions importantes sur l'initiation de la réponse spécifique amorcée par les lymphocytes.

3.1.2.2 Altération de la réponse spécifique

La réponse cellulaire ainsi que la réponse humorale sont toutes deux altérées suite au traumatisme, ce qui peut expliquer l'état d'immunosuppression chez les patients brûlés. Le relâchement d'endotoxines observé lors d'une brûlure sévère pourrait modifier certaines des fonctions de la réponse cellulaire et humorale (Moran et Munster, 1987). Comme les endotoxines sont des stimuli importants de la cascade inflammatoire (Harris, Gelfand 1995), impliquant la production du TNF- α , d'IL-1, du NO et des PGE₂, ces derniers ont la capacité d'altérer les fonctions lymphocytaires (Schawacha et *al.*, 1998; Masson et *al.*, 1998). Il a également été démontré une diminution de l'activation des lymphocytes B suite au traumatisme (Schulter et *al.*, 1990). La synthèse d'IL-4 et d'IL-2, cytokines essentielles à l'expression du récepteur CD23 sur les cellules B, est également diminuée suite au traumatisme (Schulter et *al.*, 1990). Ainsi, après une brûlure sévère il y a une baisse significative de l'expression du récepteur CD23 et du relâchement de sa forme soluble après clivage, même en présence d'IL-2 et d'IL-4 (Schlüter et *al.*, 1991). Ainsi, suite à une brûlure, les cellules B sont réfractaires aux signaux envoyés par les cellules T auxiliaires, soit l'IL-2 et l'IL-4. De plus, la surproduction de PGE₂ supprime l'ensemble des fonctions des cellules B à l'exception de la synthèse d'IgG (Yamamoto et *al.*, 1996). Les diverses altérations observées sur la réponse cellulaire correspondent à une réduction des lymphocytes T, à une augmentation de l'activité suppressive des lymphocytes, à une augmentation de facteurs suppresseurs et à une diminution de la synthèse des cytokines et de leurs récepteurs (Barlow, 1994). Malgré que l'ensemble des études portant sur l'analyse des lymphocytes suite au traumatisme, s'entendent pour dire qu'il y a perturbations de ces derniers, il est difficile de déterminer si ces changements observés tôt après la brûlure, augmentent les probabilités d'une infection secondaire, ou s'ils découlent des effets suivant l'arrivée d'une infection.

3.2 Brûlure sévère – lymphocytes T

L'état d'immunosuppression observé chez les grands brûlés a souvent été attribué à un mauvais fonctionnement et/ou à diverses altérations des lymphocytes T. Dès 1978, une étude démontra une baisse significative du nombre de cellules T présents dans le sang et dans les organes lymphoïdes dès

les premiers jours suivant le traumatisme, corrélant avec l'incidence d'infection observée chez les patients brûlés (Wood *et al.*, 1978; Fosse, Trumphy et Skulberg, 1987). Plusieurs groupes de recherche ont remarqué une baisse simultanée du pourcentage des cellules T auxiliaires (T_H) et des cellules T cytotoxiques (T_C) périphériques chez les patients et chez le modèle murin (Hansbrough et Gadd, 1989; Antonacci *et al.*, 1984; Calvano *et al.*, 1988). Toutefois, Hunt et son équipe ont observé premièrement une baisse du nombre de cellules T_H , suivi d'une diminution de la population des cellules T_C , pour ensuite revenir à des niveaux basaux à partir du 10^e jour suivant le traumatisme (Hunt *et al.* 1998). D'autres études ont constaté une diminution du ratio des cellules T_H (CD4) par rapport aux cellules T_C (CD8), suggérant une baisse du nombre des cellules CD4 et d'une augmentation des cellules CD8, ou encore une redistribution de ces cellules dans les compartiments de l'organisme (O'Mahony *et al.*, 1985; Organ, *et al.*, 1988;). Alors que certains groupes de recherche soutenaient que la brûlure seule induisait une diminution du ratio T_H/T_C , Burleson et collaborateurs ont seulement remarqué cette baisse du ratio chez les animaux ayant été préalablement immunisés avec un Ag, avant d'être soumis au traumatisme (Burleson, Mason et Pruitt, 1988). Cette dernière analyse propose que la brûlure seule n'affecte aucunement le système immunitaire mais que l'apparition d'infections subséquentes serait l'agent responsable des modulations de l'immunité. À partir d'un modèle murin, Organ *et al.* ont noté une baisse du nombre total de lymphocytes dans les 6 jours suivant la brûlure après quoi le nombre de lymphocytes augmentait considérablement au niveau de la rate et des ganglions drainant la plaie (Organ *et al.*, 1988). Toutefois, le nombre de lymphocytes au niveau du thymus et de la moelle osseuse ainsi que dans les ganglions mésentériques, demeurerait significativement inférieur pour une longue période (48-60 jours) post-trauma. Deitch et collaborateurs ont démontré que les effets d'une brûlure sévère sur les fonctions lymphocytaires variaient selon les compartiments étudiés, d'où la variété d'interprétations des résultats (Deich, Xu et Qi, 1989).

Selon que l'on étudie l'effet du traumatisme au niveau des lymphocytes de la rate, dans le plasma, dans les ganglions inguinaux, axillaires ou mésentériques ou encore au niveau des plaques de Payer, les résultats obtenus par ces diverses études ne semblent pas être tout à fait similaires sans toutefois être contradictoires. Des études réalisées dans notre laboratoire ainsi que de nombreuses études répertoriées dans la littérature, ont établi que l'effet suppressif d'une brûlure sévère sur les cellules T ainsi que l'établissement d'un état d'immunosuppression, apparaissaient entre le 7^e et le 14^e jour suivant le traumatisme (Banwell *et al.*, 1998, Jobin, Garrel et Bernier, 2000, Jobin *et al.*, 2000). Une diminution prononcée des populations lymphocytaires $CD4^+$ et/ou $CD8^+$ au-delà du 14^e jour suivant le traumatisme, corrèle positivement avec l'apparition de septicémies pouvant être fatale (McIrvine *et al.*, 1982). Outre les changements observés au niveau des populations $CD4^+$ et $CD8^+$, l'homéostasie

des cellules T naïves versus effectrices/mémoires est également modifiée suite à une brûlure sévère. Une étude portant sur l'expression des cellules T naïves (CD45RO+) et des cellules T mémoires (CD45RO-), chez le rat ayant été soumis à une brûlure sévère, a permis de noter une augmentation du nombre de cellules T CD4⁺ naïves et CD4⁺ T mémoires dans les ganglions drainant la plaie (ganglions axillaires, inguinaux) en fonction du temps (Lawrence, Riesthal et Calvano, 1996). Il a également été constaté que le nombre de cellules T CD4⁺ mémoires diminuait au niveau de la rate alors que le nombre de cellules T CD4⁺ naïves demeurait équivalent. À noter, que les changements des populations naïves versus mémoires ont été étudiés à partir du 6^e jour suivant le traumatisme et qu'aucune analyse n'ait été faite sur la distribution de ces cellules avant l'installation d'un état d'immunosuppression observé à partir du 7^e jour. Ces altérations observées au niveau de l'expression des cellules naïves et mémoires, ne sont pas uniquement la conséquence d'une baisse ou d'une hausse de la prolifération et de l'activation de ces cellules. Le traumatisme de la brûlure pourrait influencer la migration des cellules, soit vers les ganglions ou la rate changeant ainsi les proportions de cellules naïves/effectrices. Toutefois, l'immunocompétence des cellules T CD4⁺, CD8⁺ naïves et/ou mémoires est peu connue et demeure à être élucidée.

Des expériences faites avec des souris transgéniques dont les lymphocytes exprimaient tous le même TcR spécifique à un antigène unique, ont permis d'examiner les effets d'une brûlure sévère sur l'activation de cellules naïves versus effectrices suite à une immunisation (Kavanagh et *al.*, 1998). Les résultats obtenus ont démontré qu'en absence de stimulation antigénique la prolifération des cellules T n'était pas altérée suite au traumatisme, suggérant que l'antigène jouerait un rôle important dans l'état d'immunosuppression observé après une brûlure sévère. Après immunisation avec l'antigène spécifique, ils ont noté une augmentation de la capacité des cellules T CD4⁺ activées mais non de celle des cellules T CD4⁺ naïves à proliférer, engendrant par conséquent un état d'hyperactivation des cellules T activées chez les souris transgéniques soumises à une brûlure (Kavanagh et *al.*, 1998). Cette hyperactivation post-trauma contribuerait à l'induction d'un SRIS, qui dans 100% des cas étudiés a été mortel. Alors que la même approche expérimentale a été appliquée à des souris normales, ils ont observé que les cellules T activées proliféraient moins que les cellules naïves après immunisation des souris brûlées. En somme, ces résultats démontrent que suite au traumatisme de la brûlure, les cellules T activées sont réfractaires à toute stimulation par des antigènes du soi ou du non-soi, dans le but de protéger l'organisme contre une réponse inflammatoire systémique.

Outre les lymphocytes T exprimant un TcR $\alpha\beta$, certains groupes de recherche ont constaté que les lymphocytes T portant un TcR $\gamma\delta$, ne représentant qu'un faible pourcentage de l'ensemble lymphocytaire, jouaient un rôle dans l'activation des macrophages en réponse aux LPS. Il a été démontré que les lymphocytes $\gamma\delta$ stimulaient les macrophages à synthétiser le médiateur pro-inflammatoire TNF- α , augmentant ainsi les risques d'un SRIS (Nishimura et *al.*, 1995; Schwacha, Ayala et Chaudry, 2000). Cependant, il a été démontré que la présence de cellules T $\gamma\delta$ contribuait également à augmenter les chances de survie, puisque des études faites avec des souris TcR $\delta^{-/-}$ ont démontré que ce modèle murin présentait un haut taux de mortalité (Schwacha, Ayala et Chaudry, 2000). Il a également été observé que les lymphocytes T $\gamma\delta$ intraépithéliales favorisaient la production de chimiokines nécessaires au recrutement de cellules immunitaires lorsqu'il y avait lésion, par exemple suite à une brûlure (Boismenu et *al.*, 1996). Ces cellules jouent un rôle important dans l'induction d'une réponse immunitaire contre une invasion microbienne d'origine intestinale (Haas, Pereira et Tonegawa, 1993). Comme les brûlures sévères sont souvent associées à une augmentation de translocation bactérienne du tractus gastro-intestinal, les cellules T $\gamma\delta$ jouent un rôle primordial. Ainsi, les cellules T $\gamma\delta$ jouent deux rôles distincts dans l'immunopathogénicité suivant une brûlure : (1) elles contribuent à la survie et (2) elles initient des perturbations du système immunitaire en stimulant les macrophages à produire les médiateurs TNF- α et IL-6.

3.2.1 Prolifération et activation des lymphocytes T post-trauma

En plus de causer une baisse du nombre de lymphocytes T, le traumatisme de la brûlure affecte également les capacités de prolifération des lymphocytes T. Diverses études ont démontré qu'après stimulation avec des agents mitogéniques, tels que la concanavaline A (Con A) ou la phytohémmagglutinine (PHA), la prolifération *in vitro* des cellules T périphériques était inhibée vers la deuxième semaine, chez les patients gravement brûlés, (Schlüter et *al.*, 1991; Deitch, Xu et Qi, 1989; Salo et *al.*, 1979, O'Mahony et *al.*, 1984; De Kumar et *al.*, 1997). Cette incapacité à répondre à un stimulus mitogénique peut être d'origine multifactorielle et jouerait un rôle important dans l'état d'immunosuppression des grands brûlés, sans toutefois connaître les mécanismes exacts (Antonacci, et *al.*, 1984). Une des causes principales de cette diminution de prolifération s'expliquerait par une baisse de synthèse d'IL-2, une cytokine essentielle à la prolifération et à l'activation des lymphocytes T (Teodorczyk-Injeyan et *al.*, 1986). Une baisse de l'expression de l'ARNm d'IL-2 pourrait expliquer la réduction de sa synthèse. Horgan et collaborateurs ont observé que cette diminution était en partie la conséquence d'une baisse de l'expression de c-fos, au niveau pré-transcriptionnel de l'ARNm de l'IL-2 (Horgan et *al.*, 1994). La brûlure causerait une diminution de l'expression de la protéine c-Fos,

qui agit en duo avec c-Jun constituant la protéine AP-1, cible majeure lors de l'activation de PKC et essentielle à la transcription du gène IL-2 (Horgan et *al.*, 1994). Alors que c-Jun est exprimé de façon constitutive dans les lymphocytes en périphérie, le proto-oncogène c-Fos est induit suite à l'activation des cellules T (Horgan et *al.*, 1994). En absence de c-Fos, la protéine c-Jun peut se lier à la région du promoteur mais aucune transcription du gène IL-2 n'aura lieu, d'où une baisse de la prolifération lymphocytaire. D'autres groupes de recherche ont également démontré une défectuosité entre l'activation de PKC et la transcription de c-fos, inhibant ainsi la production d'IL-2 (O'Riordan et *al.*, 1993).

Le pouvoir actif de l'IL-2 sur les cellules T se fait via sa liaison avec son récepteur l'IL-2R. Le processus d'activation des cellules T est souvent associé à la sécrétion d'IL-2 et au niveau d'expression d'IL-2R. *In vitro* et *in vivo* les lymphocytes T activés relâchent également une forme soluble du récepteur de faible affinité pour l'IL-2, désigné comme l'IL-2R α communément appelé Tac ou CD25 (Rubin et *al.*, 1985; Yasuda et *al.*, 1988). Ainsi, la capacité d'exprimer à la surface l'IL-2R et de sécréter la forme soluble de l'IL-2R α et la cytokine IL-2, sont de bons indicateurs d'activation des lymphocytes T. Jusqu'à présent plusieurs études ont noté une baisse de l'expression du IL-2R sur les cellules T provenant de patients brûlés (Teodorczyk-Injeyan et *al.*, 1987; Wood et *al.*, 1984). La diminution de synthèse d'IL-2 observée chez les patients brûlés, peut également avoir pour conséquence d'inhiber la génération et/ou le maintien des IL-2R exprimés sur les lymphocytes T (Teodorczyk-Injeyan et *al.*, 1987). Parallèlement, il a été mentionné que cette incapacité des cellules T à synthétiser de l'IL-2, à exprimer l'IL-2R et à proliférer en réponse à un agent mitogène, était en partie la conséquence d'une forte apparition de cellules T immatures (Teodorczyk-Injeyan et *al.*, 1986). Toutefois, il a été démontré que les cellules de patients brûlés étaient capables de produire de l'IL-2 lorsque ces dernières étaient stimulées en présence de l'ester de phorbol et un ionophore du calcium (Teodorczyk-Injeyan et *al.*, 1988). Ces derniers étant deux agents mitogéniques agissant au niveau de la voie de signalisation intracellulaire. Une fois traitées avec ces agents chimiques, les cellules ont réagi par une hausse de l'expression de l'IL-2R α comparable à celle obtenue avec le groupe contrôle. Ce résultat a donc démontré la capacité des cellules à être activées (Teodorczyk-Injeyan et *al.*, 1988). Ces dernières observations suggèrent que les diverses altérations au niveau de la synthèse de l'IL-2, sont la conséquence d'une mauvaise signalisation intracellulaire affectant ainsi l'expression du récepteur de surface lors de l'activation des cellules T.

À l'opposé de ces dernières études, l'équipe de Horgan a noté un niveau d'expression normal du récepteur IL-2R à la surface des cellules T de patients brûlés (Horgan et *al.*, 1994). En aucun moment,

une baisse d'expression du récepteur IL-2R α a été observée suite au traumatisme de la brûlure. De plus, la liaison d'IL-2 n'a pas semblé être affectée après la brûlure, puisque l'addition *in vitro* d'IL-2 recombinant aux lymphocytes T isolés de patients, a pu restaurer la baisse de prolifération de ces dernières, confirmant ainsi la présence du récepteur IL-2R. Pour cette équipe de recherche le récepteur IL-2R n'est aucunement affecté et seule la synthèse d'IL-2 est réduite suite au traumatisme, ce qui serait responsable des diverses altérations observées au niveau de la prolifération et de l'activation lymphocytaire.

Quelques hypothèses peuvent expliquer l'absence de prolifération *in vitro* des cellules T. Une étude a clairement démontré que la suppression des lymphocytes T à proliférer *in vitro* était dépendante de la présence des macrophages dans le milieu. L'élimination des macrophages de la population cellulaire avait pour effet de rétablir la prolifération des lymphocytes à des niveaux comparables à ceux du groupe contrôle (De et *al.*, 1997). La capacité de prolifération *in vitro* des lymphocytes T peut être altérée par la présence de macrophages/monocytes, qui sécrètent des agents immunosuppresseurs tels que les PGE₂ ou le TGF β , altérant ainsi la production d'IL-2 (Kumar et *al.*, 1997). Les PGE₂ ont la capacité d'agir au niveau fonctionnel des lymphocytes T via une hausse de l'activation de l'adénylyl cyclase, générant un niveau élevé d'AMP_c intracellulaire et par conséquent, altérant ainsi la synthèse d'IL-2 (Schwacha et *al.*, 1999). Après une brûlure sévère, les cellules T sont plus sensibles à la présence d'AMP_c ce qui conduit à une mauvaise activation de la phospholipase C et résulte en une baisse de DAG et de l'activation de PKC (Schwacha et *al.*, 1999). Il a également été démontré que le relâchement des PGE₂ lors d'un choc septique contribuait à la suppression de la prolifération des cellules T ainsi qu'à la synthèse d'IL-2, par inhibition de l'activation de la protéine tyrosine p59^{fyn} (Choudhry, Uddin et Sayeed, 1998). Cependant l'altération de l'activité de p59^{fyn} n'est pas due à une diminution de son expression protéique, mais serait la conséquence d'une baisse de sa propre phosphorylation ainsi que de sa capacité à phosphoryler les autres résidus de tyrosine présents sur d'autres protéines (Choudhry, Uddin et Sayeed, 1998). Ainsi, la phosphorylation de PLC- γ 1 par fyn aura pour conséquence d'hydrolyser PIP₂ en ses produits, IP₃ et DAG. La fonction d'IP₃ est d'initier le relâchement du [Ca²⁺]_i nécessaire à l'activation, la prolifération et la production de cytokines des lymphocytes T. Les perturbations observées au niveau de la protéine fyn ont pour conséquence d'atténuer la signalisation intracellulaire initiée par le [Ca²⁺] et donc de réduire la réponse proliférative des lymphocytes T.

Les changements observés au niveau de la capacité à proliférer des lymphocytes T peuvent être également la conséquence d'une mauvaise activation de ces derniers. L'équipe de O'Suilleabhain a

noté diverses altérations au niveau de l'activation du complexe de NF- κ B et de la liaison de la protéine AP-1 9 jours suivant le traumatisme; ces modifications corrélant avec une diminution de l'ARNm de l'IL-2 chez les cellules T CD4⁺ stimulées avec l'agent mitogène Con-A (O'Suilleabhain et *al.*, 2001). De plus, ces changements au niveau de l'activation de NF- κ B et d'AP-1 joueraient un rôle dans le transfert de polarisation des cytokines de type Th1 vers Th2 ainsi que dans l'établissement d'un état d'anergie, suite au traumatisme. Puisque AP-1, NF κ B et C-Jun/C-fos sont impliqués dans la régulation de plusieurs gènes, ces derniers résultats supportent l'idée que le traumatisme d'une brûlure altère l'expression des gènes des cellules T diminuant ainsi leur activation et leur prolifération. Jusqu'à présent on ne sait pas si ces modifications de l'activation de NF κ B et d'AP-1 sont la conséquence d'une mauvaise présentation antigénique par les macrophages, les cellules dendritiques ou les cellules B, ou sont le résultat direct des perturbations au niveau des lymphocytes T. Cependant, il a été démontré que cette dépression de la présentation antigénique contribue à diminuer l'activation des cellules T, plus particulièrement les cellules CD4⁺. La présence de PGE₂ a pour conséquence d'inhiber l'expression du CMH de classe II, altérant ainsi l'interaction entre les CPA et les lymphocytes T d'où l'apparition d'une mauvaise activation (Stephan et *al.*, 1988).

Alors que plusieurs groupes de recherche ont remarqué une baisse de l'activation, l'équipe de Kataranovski a constaté une hausse de l'activation des cellules T au niveau des ganglions drainant la plaie (ganglions axillaires et scapulaires) chez le modèle du rat (Kataranovski et *al.*, 1992). Cette activation des cellules T a été notée par leur capacité à produire de l'IL-2, ainsi que par les niveaux d'IL-1 et d'IL-6 présents dans les suspensions cellulaires de ganglions. Les lymphocytes T présents dans les ganglions seraient activés suite à la libération de produits, tels que les "heat shock protein" (HSP), les antigènes du soi, les microorganismes et/ou les cytokines présentes au site d'inflammation. Cette activation au niveau des ganglions pourrait également expliquer la hausse de cellules T activées en périphérie. L'équipe de Teodorczyk-Injeyan a noté, près de 24 heures suivant le traumatisme de la brûlure, une augmentation significative de l'expression de la molécule CD25 (IL-2R α) et que ce niveau est demeuré supérieur à la normal dans les jours suivants (Teodorczyk-Injeyan et *al.*, 1989). Associée à la présence de cellules T activées en périphérie, une augmentation des niveaux plasmatiques d'IL-2 a également été observée chez les patients (Teodorczyk-Injeyan et *al.*, 1991). Selon cette dernière étude, l'augmentation d'IL-2 et de la forme soluble de son récepteur, soit l'IL-2R α , appuie l'hypothèse d'une activation immédiate des cellules T *in vivo* chez les patients brûlés. Malgré cette activation *in vivo*, ces cellules T semblaient être incapables de proliférer *in vitro* après une stimulation mitogène. Toutefois, plusieurs études n'ont pas été en mesure d'identifier une augmentation de l'IL-2 et de l'IL-2R plasmatique suivant une brûlure (Jobin, Garrel et Bernier, 2000;

Horgan et *al.*, 1994; O’Riordain et *al.*, 1995). En réponse à un stress, l’axe hypothalamus-hypophysaire peut également produire une variété de cytokines dont l’IL-2, expliquant en partie cette hausse des niveaux plasmatiques d’IL-2 sans être associée à une augmentation de l’activation lymphocytaire (Turnbull et Rivier, 1999). Malgré une activation immédiate des cellules T suivant une brûlure, aucune équipe n’a été à même de déterminer la spécificité de ces cellules activées suite au traumatisme.

3.3.2 Polarisation des cytokines de type TH1 versus TH2

Un principe important qui émerge de l’étude des cytokines est que la nature et l’amplitude de la réponse immunitaire seront influencées par le relâchement des diverses cytokines produites aux sites de stimulation des lymphocytes. Suite à l’évaluation des cytokines produites après une brûlure, plusieurs études ont démontré un changement au niveau des réponses de type Th1 vers une réponse de type Th2 (O’Sullivan et *al.*, 1995). Cette augmentation de synthèse des cytokines IL-4, IL-10 ainsi que PGE₂ a pour effet d’inhiber les cytokines de type Th1 telles que IL-12 et INF- γ (Kavanagh et *al.*, 1999). En fait, plus il y a production d’IL-10, plus les cellules CD4⁺ sont dans l’incapacité de synthétiser de l’IL-2 (Ayala et *al.*, 2001). Il a été démontré que suite au traumatisme de la brûlure, une hausse d’IL-10 augmentait les niveaux d’apoptose chez les lymphocytes de type Th1 présents dans la rate, puisqu’en présence d’anticorps anti-IL-10, il y avait une baisse significative de cellules en apoptose. Les lymphocytes CD4⁺ sont la source majeure de production d’IL-10, augmentation corrélant avec l’apparition du choc septique chez les patients et une diminution à répondre aux infections secondaires chez le modèle murin (Lyons et *al.*, 1997). De plus, il a été observé que l’action inhibitrice de l’IL-10 sur les cellules T, se faisait via l’inhibition de l’expression des molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CMH de classe II lors de la présentation antigénique des CPA (Ding et Schevach, 1992; Ding et *al.*, 1993). En plus d’agir au niveau des cellules de la rate, il a été prouvé que l’IL-10 inhibait l’activation et la stimulation des lymphocytes présents dans les intestins diminuant toute réponse inflammatoire (Ebert, 2000). Cette augmentation de production d’IL-10 chez les patients brûlés corrèle souvent avec l’apparition de cas de septicémie (Lyons et *al.*, 1997).

Parallèlement à une augmentation d’IL-10, une baisse significative d’IL-12 produite par les monocytes/macrophages périphériques a été notée chez les patients brûlés, et au niveau de la rate dans le modèle murin (Göebel et *al.*, 2000). Puisqu’une des fonctions principales de l’IL-12 est de permettre aux cellules T naïves de se différencier en cellules T effectrices de phénotype Th1, cela

expliquerait en partie l'incapacité de maintenir une réponse de type Th1 suite au traumatisme. Cette diminution de synthèse des cytokines de type Th1 a pour conséquence d'inhiber l'activation et/ou la prolifération des lymphocytes T_H (Teodorczyk-Injeyan et al., 1986). La diminution des cellules T_H activées serait une des causes responsable de la baisse de synthèse d'Ig des lymphocytes B suite au traumatisme de la brûlure (Schluter et al., 1990). Kelly et ses collègues ont démontré qu'une diminution significative de l'INF- γ , produit par les cellules T de type Th1, provoquait une baisse de la synthèse de l'anticorps d'IgG2a, cette dernière étant INF-dépendante (Kelly et al., 1999). Outre l'induction de cytokines de type Th2, la brûlure induirait également une augmentation d'IL-6, de TNF- α et d'IL-1 sécrétés par les macrophages (Gregory et al., 2000). Il a été démontré qu'une forte concentration d'IL-6 supprimait les fonctions des cellules T et jouait un rôle au niveau de la suppression de la réponse cellulaire après le traumatisme de la brûlure (Zhou, Munster et Winchurch, 1992). Cette hausse de médiateurs inflammatoires produits par les macrophages est influencée par la présence des lymphocytes T $\gamma\delta$, autant *in vivo* qu'*in vitro*. Cette dernière observation a été démontrée suite à l'analyse de production des médiateurs inflammatoires par les macrophages chez les souris déficientes $\delta^{-/-}$ (Nishimura et al., 1995).

Puisque les cellules T_H sont essentielles à la maturation des cellules CD8 cytotoxiques via la sécrétion de cytokines telles que l'IL-2 et l'INF- γ , ces cellules cytotoxiques seront également affectées suite au traumatisme (Gill et al., 1993). Par contre 14 jours suivant le traumatisme de la brûlure, l'équipe de Hunt a noté une augmentation de la réponse cytotoxique démontrée par une hausse des cellules CD8⁺ effectrices, cellules ayant préalablement reconnu un antigène et induit une réponse immunitaire. Dans les faits, la brûlure sévère et le relâchement d'endotoxines induisent des altérations considérables au niveau des lymphocytes, perturbations qui sont en majeure partie responsables de l'état d'immunosuppression.

3.4 Rôle de l'apoptose post-trauma

L'état d'immunosuppression suite au traumatisme de la brûlure peut également résulter d'une augmentation de l'apoptose et/ou d'une forte induction d'anergie des lymphocytes. La mort cellulaire des lymphocytes peut être responsable de la diminution de lymphocytes T circulants, ou de l'inhibition de leur prolifération et de leur activation. Diverses études ont clairement démontré que suite à un traumatisme tel une brûlure ou un choc septique, il y avait diminution de la cellularité au niveau des organes lymphoïdes et augmentation du nombre de cellules en apoptose (Ayala et al., 1999; Fukuzuka et al., 1999; Oka et al., 1996). Par exemple, suite à l'injection de bactéries Gram-négatives et Gram-

positives, l'équipe de Wang a observé une atrophie du thymus via l'induction du processus apoptotique (Wang et *al.*, 1994). De plus, Sugimoto et ses collègues ont noté suite à une chirurgie majeure, une hausse de l'expression de l'ARNm de FasL et une corrélation entre la cinétique de son induction et une augmentation de la susceptibilité des cellules mononucléaires à entrer en apoptose (Sugimoto et *al.*, 1998). Bien que les mécanismes de l'apoptose observée post-trauma soient peu connus, on sait que ce mode de mort cellulaire est fréquemment élevé et est suivi d'une réponse inflammatoire. De plus, il peut être induit autant dans les tissus lymphoïdes que dans les tissus parenchymateux, par des cytokines telles que le TNF- α ou l'expression de Fas-L (Nagata et Golstein, 1995).

3.4.1 Voies d'activation de l'apoptose suivant une brûlure sévère

Qu'en est-il de l'induction de l'apoptose suite à une brûlure sévère? L'équipe de Teodorczyk-Injeyan a été la première à observer chez les patients gravement brûlés une induction d'apoptose au niveau des lymphocytes circulants, ainsi qu'au niveau des lymphocytes T isolés et activés *in vitro*, suivie d'une diminution d'IL-2 (Teodorczyk-Injeyan et *al.*, 1995). À partir de ce moment on a admis que l'induction de mort cellulaire par AICD représentait un mécanisme probant pour inhiber une réponse immunitaire dite exagérée, représentée par une forte activation des lymphocytes T matures. Dans cette dernière étude, il a été noté que les cellules apoptotiques exprimaient des niveaux élevés de marqueurs d'activation systémique, soit CD25 et CD69, et qu'on retrouvait même au niveau plasmatique des quantités élevées de marqueurs d'activation solubles (Teodorczyk-Injeyan et *al.*, 1995). Ces dernières observations sont consistantes avec la relation causale qui existerait entre l'activation périphérique des lymphocytes matures et l'état d'immunosuppression. Les principaux facteurs qui induisent l'activation des cellules T suivie de l'apoptose (AICD) restent encore à être identifiés. Selon certaines études, l'AICD associée à une fragmentation de l'ADN chez les lymphocytes T matures, serait précédée par une forte activation de ces derniers suite à une exposition à des dérivés bactériens ou viraux collectivement nommés superantigènes (Herman et *al.*, 1991; König et *al.*, 1992). Des données récentes ont également démontré que suite à une stimulation prolongée *in vitro* des lymphocytes T périphériques matures, avec un superantigène et en présence d'IL-2, ces derniers étaient fortement induits en apoptose chez l'humain (Kabelitz et Wesselborg, 1992; Wesselborg, Janssen et Kabelitz, 1993). Ainsi, suite au traumatisme de la brûlure l'activation inadéquate des cellules T pourrait être responsable de leur induction d'apoptose ou de leur anergie.

L'engagement du récepteur de mort Fas par l'interaction avec son ligand FasL est également impliqué dans le processus de mort AICD, puisque chez les souris déficientes au niveau du gène FasL, les

niveaux d'apoptose par AICD n'étaient pas régulés à la hausse après stimulation mitogène avec ConA (Ayala et *al.*, 1999). L'équipe d'Ayala a démontré que parmi les médiateurs inflammatoires tels que l'IL-4, l'IL-10 et les PGE₂, seul l'IL-10 altérait à la hausse la fréquence d'apoptose des lymphocytes T activés au niveau de la rate du modèle murin (Ayala et *al.*, 2001). Lors de la stimulation des cellules de la rate, l'ajout d'Ac anti-IL-10 avait pour effet d'atténuer l'augmentation du procédé apoptotique AICD. Ces mêmes expérimentations ont également permis d'observer qu'en présence d'Ac anti-IL-10, l'expression de Fas, FADD, TRADD et FLICE était grandement diminuée chez les lymphocytes. Des souris déficientes au niveau du gène de l'IL-10 soumises à un choc septique, ont présenté des niveaux apoptotiques équivalents à ceux observés chez le groupe contrôle; autre étude appuyant l'effet suppresseur de l'IL-10 (Ayala et *al.*, 2001). À noter que la cytokine IL-10 possède autant des propriétés anti-apoptotiques que pro-apoptotiques, dépendamment des lymphocytes étudiés et des conditions de l'étude.

À partir d'un modèle murin, une augmentation de l'apoptose au niveau des cellules du thymus et de la rate a également été signalée, 3 heures suivant une brûlure (Fukuzuka et *al.*, 1999; Ayala et *al.*, 1999). Une augmentation de l'expression FasL sur les cellules du thymus et de la rate, peut expliquer cette hausse d'apoptose chez les souris brûlées (Malcom et *al.*, 2000). Étant donné que l'expression de FasL semblait jouer un rôle important suivant un traumatisme, une équipe de recherche a voulu établir si la présence de cette molécule altérait l'activité des cellules T suite à une brûlure sévère. Ainsi, à partir de modèles murins déficients en l'expression de Fas (*lpr*), ils ont noté après une brûlure sévère, un plus grand taux de survie chez ces souris en comparaison avec le groupe témoin. Ces derniers résultats suggèrent fortement que la présence de Fas joue un rôle essentiel dans la modulation d'une réponse immunitaire suite à une brûlure sévère (Kell et *al.*, 2000).

Certains groupes de recherche s'entendent pour mentionner que l'induction de l'apoptose est indépendante de la présence de TNF- α et des endotoxines suivant une brûlure sévère. Ainsi, ils ont démontré chez des souris C3H/HeJ (résistantes aux LPS) et TNF- α null, que l'induction de l'apoptose était associée à une augmentation de l'activité de la caspase-3 dans le thymus et la rate (Fukuzuka et *al.*, 1999; Hiramatsu et *al.*, 1997; Ayala et *al.*, 1996). Certaines études ont également souligné l'absence de modulation des niveaux plasmatiques de TNF- α chez les patients gravement brûlés ayant survécu ou non au traumatisme de la brûlure (Yamada, Endo et Inada, 1996; Ribeiro et *al.*, 2002). Toutefois, lorsqu'il y avait présence d'infections suivant le traumatisme, les niveaux de TNF- α étaient significativement élevés en comparaison avec le groupe contrôle (Yamada, Endo et Inada, 1996; Yamada et *al.*, 2000). Contrairement aux études portant sur la modulation de TNF- α , les analyses

faites sur l'expression des récepteurs TNFR ont démontré une augmentation de ces derniers chez les patients n'ayant pas survécu au traumatisme de la brûlure (Yamada *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2002). Les niveaux d'expression de TNFR1 et de TNFR2 étaient hautement supérieurs, 6 et 24 heures suivant la brûlure, chez les patients décédés suite à ce traumatisme en comparaison avec les patients ayant survécu. Ces dernières études suggèrent donc que les concentrations de TNF- α et le niveau d'expression de ses récepteurs sont tous deux de bons indicateurs de la gravité d'une brûlure. À l'opposé, Cho et ses collaborateurs ont clairement observé 3 heures suivant le traumatisme de la brûlure, une augmentation de TNF- α dans le thymus seulement. De plus, il a été démontré que ce médiateur inflammatoire jouait un rôle important dans l'induction de l'apoptose des thymocytes, via sa liaison avec son récepteur de haute affinité TNFR (Cho *et al.*, 2001). Certaines études ont également observé que le relâchement prononcé de LPS et d'endotoxines suite à une brûlure sévère, semblait être responsable de l'induction massive d'apoptose au niveau des lymphocytes périphériques et au niveau des cellules présentes dans les ganglions mésentériques (Xia *et al.*, 2002). D'autre part, les glucocorticoïdes, dont les concentrations augmentent suite à une brûlure sévère (Faunce, Gregory et Kovacs, 1998), réguleraient à la hausse l'activation de la caspase-3 lors de l'induction de l'apoptose (Fukuzuka *et al.*, 2000). En fait, les glucocorticoïdes seraient les premiers activateurs de la caspase-3 au niveau des lymphocytes du thymus et de la rate, enclenchant ainsi la cascade apoptotique suivant une brûlure. Ce stéroïde induirait également l'apoptose des cellules CD8⁺ et des lymphocytes B (B220⁺) présents dans les plaques de Payer. De plus, il serait en partie responsable de l'induction de mort cellulaire chez les lymphocytes intraépithéliale (IEL), résidant à la surface basolatérale des cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal (Fukuzuka *et al.*, 2000). L'expression de FasL sur les lymphocytes B contribuerait également à l'induction de l'apoptose puisque chez les souris FasL-déficientes, l'apoptose des lymphocytes B n'était pas régulée à la hausse alors que les cellules CD4⁺/CD8⁺ demeuraient hautement en apoptose, après une brûlure sévère (Kell *et al.*, 2000).

3.5 Induction de l'anergie post-brûlure

Suite au traumatisme de la brûlure les lymphocytes T ont une capacité moindre à proliférer, expriment peu d'IL-2R et produisent moins d'IL-2, leur conférant ainsi un état d'anergie. Comme il a été mentionné, une perte de la liaison du complexe AP-1 au facteur de transcription NF- κ B diminue la transcription du gène de l'IL-2, d'où une baisse de sa synthèse suite à une brûlure sévère, provoquant ainsi un état d'anergie des cellules T (O'Suilleabhain *et al.*, 2001). De plus, il a été démontré chez des clones de cellules T CD4⁺ rendus anergiques *in vitro*, une défectuosité semblable de l'activité d'AP-1. Cette dernière perturbation impliquerait une réduction de la translocation nucléaire des protéines C-

Fos, FosB et JunB, toutes nécessaires à la transcription de l'IL-2 (Mondino et *al.*, 1996). Cette suppression des fonctions effectrices des lymphocytes peut être en partie la conséquence d'une forte production de PGE₂ par les macrophages. Comme il a été mentionné auparavant, cet agent immunosuppresseur inhibe les CMH de classe II, affectant la présentation antigénique ou simplement en altérant certaines protéines kinases lors de l'activation des lymphocytes T. De plus, l'intensité de la brûlure peut également induire une forte activation des cellules T qui est souvent accompagnée d'une diminution de synthèse d'IL-2 (De et *al.*, 2000). Cette suppression d'IL-2 est souvent le résultat d'une hausse d'IL-4 et d'IL-10, pouvant inhiber la présentation antigénique des CPA, d'où l'apparition de cellules T anergiques.

Si toutefois la polarisation de TH1 vers TH2 ne permet pas d'expliquer intégralement l'état d'anergie, De et collaborateurs ont suggéré que des altérations au niveau de l'expression de certains récepteurs seraient en partie responsables de cet état d'inactivation. Ils ont noté que le phénotype CD3^{low}CD11b^{high} et CD28^{low} était prédominant dans la population de cellules T anergiques chez les patients brûlés, résultant de cellules T fortement activées et Fas-résistante (De et *al.*, 2000). Ces dernières cellules seraient capables de présenter un antigène, puisqu'elles sont CD11b^{high}, à d'autres cellules T, les rendant à leur tour anergiques. De plus, le relâchement de protéines du soi dégradées et d'auto-anticorps, communément appelés peptides altérés, stimulerait les cellules T préalablement activées, les rendant anergiques. Pellegrini et *al.* ont stipulé que l'augmentation de l'apoptose chez les lymphocytes post-brûlure causent directement l'anergie de ces cellules (Pellegrini et *al.*, 2000). Cette équipe de recherche suggère que suite à une forte induction d'apoptose des cellules matures, il ne resterait plus qu'une population formée en majeure partie de cellules naïves, cellules qui sont plus susceptibles d'être anergiques, dû à leurs besoins astringents d'être activées par des CPA professionnelles. À noter que la présence de CPA non professionnelles, i.e. dont les molécules de co-stimulation sont altérées, est également une cause de l'état d'anergie de cellules T. En somme, les mécanismes responsables de l'état d'anergie des cellules T peuvent être de multiples origines et demeurent à être clairement identifiés. Cependant, nul doute que l'apoptose et l'anergie agissent en synergie, pouvant amener l'état d'immunosuppression.

En somme, le traumatisme d'une brûlure sévère perturbe grandement l'immunité des patients. Malgré que le système immunitaire de ces patients semble être mis en branle suite au traumatisme, les fonctions de ce dernier sont modifiées. Suite à une augmentation d'endotoxines, d'Ag altérés du soi, de HSP ou autres suivant le traumatisme de la brûlure, une forte activation au niveau des

compartiments lymphoïdes et en périphérie a été démontrée par une augmentation du récepteur soluble IL-2R et des niveaux d'IL-2 dans le plasma des patients (Teodorczyk-Injeyan et *al.*, 1991). Maldonado-Lopez et collaborateurs ont également noté une augmentation de lymphocytes T activés, par une hausse de l'expression de marqueurs d'activation tels que CD25, CD69 et CD71 (Maldonado-Lopez et *al.*, 1991). Toutefois, nul n'a été en mesure de démontrer une forme d'activation des lymphocytes T en fonction du temps ainsi que la nature des cellules T activées. Alors que certaines études observent une forme d'activation des cellules T suite au traumatisme de la brûlure, plusieurs s'entendent pour confirmer que ce traumatisme induit diverses perturbations au niveau de l'activation lymphocytaire. L'absence d'activation des lymphocytes peut être en partie la conséquence d'une forte induction d'apoptose et/ou d'anergie (Teodorczyk-Injeyan et *al.*, 1995; De et *al.*, 2000). Les changements observés au niveau de la synthèse des cytokines T_H1 versus T_H2 influencent grandement l'homéostasie des cellules T, suivant le traumatisme de la brûlure (O'Sullivan et *al.*, 1995). De plus, les diverses altérations observées au niveau des CPA pourraient induire cet état d'inactivation des lymphocytes. Ainsi, une baisse de l'expression des molécules de CMH de classe II (Grbic et *al.*, 1991) ou des molécules de co-stimulation (Ding et Schevach, 1992; Ding et *al.*, 1993), ou encore une hausse des médiateurs inflammatoires, tels que les PGE_2 (Schwacha et *al.*, 1999) et le $TNF-\alpha$, affectent potentiellement les fonctions effectrices des lymphocytes T. Élucider les effets découlant de l'état d'immunosuppression suite à une brûlure sévère est essentiel dans le développement d'une approche thérapeutique et permettra d'instaurer de nouvelles molécules immunomodulantes capables de renverser les effets néfastes du traumatisme.

SECTION 2

Burn injury induces a change in T-cell homeostasis affecting preferentially CD4+ T cells.

Patenaude Julie*, D'Elia Michele*, Hamelin Claudine*, Garrel Dominique[†], Bernier Jacques*

Journal of Immunology

RÉSUMÉ

Suite au traumatisme d'une brûlure sévère, on observe une altération du système immunitaire résultant en un état d'immunosuppression chez les patients, un phénomène impliqué dans l'apparition de septicémie. Les causes exactes engendrant cet état d'immunosuppression restent encore à être élucidées. Cependant diverses altérations observées au niveau de l'immunité acquise seraient à l'origine de ces perturbations du système immunitaire. Cette étude a été entreprise dans le but de déterminer l'impact du traumatisme d'une brûlure sévère sur l'homéostasie des lymphocytes T. Pour ce faire, nous avons étudié la capacité de prolifération, leur niveau d'expression et d'activation des lymphocytes T au niveau de la rate, ainsi que l'induction d'apoptose et/ou d'anergie. À partir d'un modèle murin soumis à une brûlure sévère de l'ordre de 20% de la surface totale, nous avons d'abord noté, dans les 5 premiers jours suivant le traumatisme, une forte diminution du nombre de cellules au niveau de la rate, suivie d'une augmentation massive de la cellularité au 10^e jour. Malgré cette répression du nombre de cellules dans la rate suite à la brûlure, il a été démontré par incorporation de 5'-bromo-2'deoxyuridine (BrdU), que les cellules lymphocytaires matures avaient une capacité plus grande à proliférer *in vivo*. Au moment même où une réduction de la cellularité au niveau de la rate était mesurée, nous avons observé une augmentation significative de l'expression des cellules T CD4⁺ et CD8⁺, plus particulièrement des cellules naïves (CD62L^{HIGH} CD44^{LOW}). Cependant, à partir du 5^e jour suivant le traumatisme de la brûlure, l'expression de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ naïves est devenue significativement réduite et celle-ci est demeurée à des niveaux inférieurs en comparaison avec un groupe témoin. L'expression des cellules T effectrices (CD62L^{LOW} CD44^{HIGH}) était également diminuée 10 jours suivant la brûlure. Toutefois, à la même période où il a été noté une diminution de l'expression des populations lymphocytaires de la rate, il a été noté que les cellules T CD4⁺ naïves et les cellules T CD4⁺ effectrices étaient fortement activées. Cette activation a été observée par une hausse de l'expression du marqueur d'activation précoce CD69⁺. Malgré cette activation, un niveau d'apoptose plus élevé a été noté chez les cellules T du groupe-brûlé. Ainsi, il a été observé que 10 jours suivant le traumatisme, les cellules T CD4⁺ naïves étaient fortement susceptibles d'entrer en apoptose en comparaison avec les cellules T CD4⁺ effectrices. De plus, nous avons également démontré que les lymphocytes T du groupe-brûlé étaient dans un état d'anergie après cette même période, indépendamment de la présence des macrophages. Ainsi, mes travaux ont mis en évidence que l'immunosuppression suite à une brûlure sévère était la conséquence d'une forte induction d'apoptose des cellules T naïves associée à une activation de ces dernières. Cet état aurait pour conséquence de changer ainsi l'homéostasie des cellules T d'où l'incapacité de générer une réponse immunitaire adéquate suite au traumatisme d'une brûlure sévère.

ABSTRACT

Burn injuries are known to be associated with altered immune functions causing a decreased resistance in case of subsequent infection. In the present study, we determined the *in vivo* changes of T-cell homeostasis after burn injury. Two groups of mice were used, 1: sham-burn group receiving buprenorphine as analgesic and 2: burn group receiving buprenorphine and subject to burn injury on 20% total body surface area. Results showed an important splenocyte decrease after burn injury persisting for 5 days and followed at day 10, by a 63 % increase of cells. *In vivo* cell proliferation, determined by the incorporation of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), showed a significant increase of cycling splenocytes between days 2 to 10 after burn injury. Percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell populations in the spleen were altered after thermal injury, even after 10 days of monitoring. Analysis of naive (CD62L^{high} CD44^{low}) and effector/memory (CD62L^{low} CD44^{high}) T-cells have shown a relative decrease not related to the expression of the CD4 or CD8 molecules. However, an early activation marker such as CD69⁺, was only expressed on CD4⁺ T-cell subsets after a time period following injury. In the later period, CD4⁺ naive T-cells showed a significant increase of spontaneous apoptosis, detected by using a fluorescent DNA binding agent 7-amino actinomycin D. CD8⁺ T lymphocyte didn't express early activation markers and were more resistant to apoptosis. Using purified T-cells, we have shown unresponsiveness state at day 10. Overall, these results demonstrated that the homeostatic mechanisms of T-cells were perturbed following burn injury. At long term, perturbation was persisted only for CD4⁺ T cells.

INTRODUCTION

Severe injury such as deep burn, induces a delayed state of immune suppression that pre-disposes patients to infection and sepsis caused by opportunistic pathogens (1). The extent of immunosuppression appears to be greater after burn injury than following other forms of trauma (2). Effector mechanisms of unspecific, as well as specific host defense are impaired following thermal trauma (phagocytosis, chemotaxis, lymphocyte proliferation, antibody production) (3,4). The hyper-production of inflammatory cytokines and over-stimulation of immune cells during inflammatory response are potential mechanisms involved during the immunosuppression (5,6).

T-lymphocyte failure to regulate the immune response is considered to be an important immunological consequence of major immunosuppression after thermal injury (7). Several studies have indicated that IL-2 production, by mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and the induction of functional IL-2R are profoundly suppressed in severely burned patients (8). On the other hand, within a day after a burn, serum levels of soluble IL-2R α increased rapidly and remained significantly above normal values (9,10). It was suggested that high systemic concentrations of the free form of IL-2R α are the consequence of T-cell activation following burn injury. However, one study has established that injury dramatically alters gene expression patterns, such as AP-1 and NF- κ B, who are involved in the regulation of many genes such as IL-2 production and T-cell activation (11). So far, it is not clear if burn injury positively or negatively altered T-cell activation. Recent studies also have established that severe injury may alter T-cell functions by causing an imbalance in T-helper cell functions resulting from the loss of Th1 down-regulation cell function or from an increase in Th2 cell activation (12). This Th2 T-cell activation has been demonstrated to be associated with reduced IL-2 production upon stimulation. Other studies have shown that the presence of suppressor CD8⁺ T-cells after burn injury could be responsible for the immunosuppression (13).

The macrophage hyper-production of arachidonic acid metabolites such as PGE₂ may suppress T-lymphocyte functions, at a lympho-proliferative response level and interleukin-2 production (14,15). PGE₂ altered macrophage effector functions and depressed antigen presenting capacity of monocytes/macrophages following trauma that may contribute to a depressed T-cell responsiveness. Also, over-production of Th2-type cytokines, such as IL-4 and IL-10, are known to act as inhibitor of antigen presenting cells (APC) (12). Immunosuppression may also result from an increased apoptosis of lymphoid cells (16-20). Induction of Fas-mediated response, release of stress mediators such as

TNF- α , glucocorticoids and granzymes, could all be involved in T-cell apoptosis. Translocation of gut bacteria and endotoxins as a consequence of the loss of physical integrity of the mucosal barrier, is a common situation after burn trauma, and may play a role in blood lymphocyte apoptosis. The abnormal apoptotic response can drive activated T-cells to anergy as a result of continuous cycles of apoptotic cell death, resulting in a residual anergic T-cell population (21). T-cell unresponsiveness may also be a consequence of a wrong activation (22). The relationship between burn injury, T lymphocyte homeostasis and immunosuppression remains to be determined.

The present study addresses T-cell homeostasis after burn injury. Using a mouse model of burn injury, splenocyte populations were characterized. T-cells expressing CD4⁺ and CD8⁺ were subdivided following their expression of CD62L and CD44 on naive or effector/memory cells. Naive T-cells, that never have encountered antigens previously, express high levels of L-selectin CD62L^{high}CD44^{low} that is used for rolling on vessel walls (23), while effector T-cells express CD62L^{low}CD44^{high}. Moreover, we have determined the expression of early activation markers, namely CD69, and the spontaneous apoptosis of cells, at different times following thermal injury. Overall, results have showed the lost of T-cell homeostasis after burn injury. Both naive and effector/memory CD4⁺ T-cells are more affected at day 10 following injury.

MATERIAL ET METHODS

Animals

All experiments were performed with 8 weeks old male C57Bl/6 mice (Charles River Laboratories, St-Constant, QC, Canada). Prior to any procedure, the mice were acclimatized for a 1 week period with controlled temperature, relative humidity, and a 12-h light/dark cycle. Each cage containing a 5 mice group was fed on standard chow (Richmond standard diet, Lab Diet, Richmond, IN) and water *ad libitum*. In accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines, the Institutional Animal Care Committee reviewed and approved all procedures performed.

Alzet Micro-osmotic Pumps

Alzet micro-osmotic pumps containing buprenorphine were used to control pain after burn injury as we previously described (24). Briefly, 24 h before the experimental day, the mice were anaesthetized with Isoflurane gas (Abbott Laboratories, Dorval, QC, Canada) before shaving the upper sternal region. Afterwards, an incision was made in the upper sternal skin to sub-cutaneously insert an Alzet micro-osmotic pump. Surgical sutures were used to close the wound. The pump delivers 0.1mL/kg of buprenorphine (Reckitt and Coleman Pharmaceuticals, Richmond, Va) per 12 h which represents the equivalent of 2.0 $\mu\text{g}/12\text{ h}$ of buprenorphine for a 20-g mouse. In our previous studies, buprenorphine had no detrimental effect on the immune response (24, 25).

Experimental Thermal Injury

Animals were randomized into 2 groups of 5 mice as follow: (1) buprenorphine-filled pumps with sham injury or (2) buprenorphine-filled pumps with burn injury. After anaesthesia, the animals were placed in a custom-insulated mould exposing 20% of their total body surface area (TBSA) on the dorsal aspect before being immersed for 7 s in either room temperature water (22°C) for sham burn or in 90°C water to produce a full-thickness burn as we previously reported (Jobin et al, 2000a). All animals received a 2 mL i.p. injection of saline for fluid resuscitation while a topical antibacterial agent (silver sulfadiazon cream, Smith and Nephew, Lachine, QC, Canada) was applied on the burned areas (Jobin et al, 2000a). All mice both survived the surgery and the thermal injury. Burned mice moved, ate, and drank normally throughout the observation period.

Sacrifice and Organ preparation

1, 5 and 10 days after the thermal injury, the animals were anaesthetized with Isoflurane gas (Abbott, Dorval, QC, Canada) and killed by cardiac puncture. Spleens were aseptically removed and immediately prepared for the study.

Preparation of Spleen Cell Suspensions

Spleens of each mice were aseptically removed and individually prepared as single-cell suspensions in 3 mL of RPMI 1640 (BioMedia, Drummundville, QC, Canada) supplemented with 10% of heat-inactivated FBS (BioMedia), 50 μ M 2-mercapthethanol (Sigma, St-Louis, MO, USA) and antibiotic solution (100U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin (BioMedia). Splenocyte suspensions were obtained by tearing apart the splenic matrix. The red blood cells were removed by lysis (Gey's solution with NH_4Cl). The viability of washed cells was assessed by trypan blue exclusion and was consistently greater than 90%. The cell count was then adjusted at the desired concentration using complete RPMI for further studies.

In vivo cell proliferation

In vivo cell proliferation was determined by 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation as described by Vasseur *et al.* (26). Thus, 15 h and 1 h before the sacrifice, mice were i.p. injected with 100 μ L of PBS containing 1mg/mL of BrdU (Sigma, St-Louis, MO, USA). Sixty minutes after the second BrdU injection, lymphoid organs (spleen, lymph nodes) were harvested for BrdU detection. Splenocytes (2.0×10^6 cells /mL) were fixed overnight in a 95% ethanol solution at 4°C. The next day, washed cells (10^5 cells/100 μ L) were incubated for 20 min with 3N HCl, then 5 min with a 0.1 M sodium borate solution at room temperature for cellular DNA denaturation. After two washes with HBSS, the cells were further incubated for 1 h at room temperature with anti-BrdU mAb FITC-conjugate (Roche, Mississauga, ON, Canada) to detect BrdU incorporation. Again, the cells were washed twice with HBSS before being analyzed on a FACScan® (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada). WinMDi software was used for the analysis.

Flow Cytometry for splenocyte phenotyping

Cells were analyzed by three-color flow cytometry with a FACScan® (Becton Dickinson) apparatus. Splenocytes (10^5 cells/100 μ L) were incubated for 30 min on ice in the presence of fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies: rat anti-mouse anti-CD4 FITC-labeled molecule (eBioscience, San Diego, Ca, USA) or rat anti-mouse anti-CD8a FITC-labeled molecule (eBioscience), with either anti-mouse anti-CD69 PE-Cy5 conjugated molecule (eBioscience) for activation detection, biotinylated anti-mouse anti-CD62L L-selectine molecule (Cedarlane, Hornby, ON, Canada) for naive T-cells detection, biotinylated anti-mouse anti-CD44 molecule (eBioscience) for effector/memory T-cells detection. Splenocytes were also stained for macrophage expression by using a rat anti-mouse F4/80 FITC-labeled molecule (Serotec, Hornby, ON, Canada). The cells were then washed twice with cold HBSS, 1% BSA, 0.1% sodium azide (Sigma) and analyzed on FACScan® (Becton Dickinson) while WinMdi software was used for the analysis.

Purification of T-cells

Splenocytes were depleted of macrophages by glass adherence to a FCS-treated petri dish for 90 min at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Non-adherent cells were washed away from petri dishes with warm PBS 2% FCS; the resulting macrophages were scraped with a policeman. The non-adherent populations (>90 % lymphocytes) were essentially free of monocytes (with < 1 % contamination) as determined by flow cytometry analysis. The lymphocyte population was washed twice with PBS 2% FCS, adjusted at the desired concentration and applied to a mouse T cell recovery column kit (Cedarlane) according to the manufacturer's procedure. Mouse T cell recovery column efficiently removed more than 95% of B cells from the mouse lymphocyte populations. The T-cell populations were then used for proliferative respond assays and flow cytometry analysis.

Apoptosis determination

Laddering of purified T-cells. Evaluation of internucleosomal DNA fragmentation was performed by standard agarose gel electrophoresis as previously described. Briefly, 12 h after incubating with or without coated anti-TcR (H57) mAb, T-cells (1.0×10^6) were washed twice in ice-cold PBS, and resuspended in a 100 μ L of lysis buffer (50mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.5% Sarkosyl) with 0.5mg/mL of Proteinase K and incubated at 50°C for 1 h. RNase solution (5 μ g/mL) was added to

the samples before being incubated for an additional 1 h at 50°C, following by addition of 10% of 3M sodium citrate and further incubated for 30 min at room temperature. Loading buffer was added and the samples were then loaded on a 1.5% agarose gel and electrophoresed at 45 V for 2 h in TBE (0.5X). The DNA ladder was stained with ethidium bromide (EtBr) and visualized by UV illumination using a Fluor S-MultImager (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada).

Flow cytometry apoptosis assessment. After 12 h of incubation at 37°C, T-cells were washed before proceeding to apoptosis detection and quantification with three-color flow cytometry by staining with 7-amino-actinomycin D (7AAD (Sigma)) and specific mAb. Briefly, T-cells (2×10^5 cells/100 μ L) were incubated for 30 min on ice in the presence of fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies: rat anti-mouse anti-CD4 FITC-labeled molecule (eBioscience) or rat anti-mouse anti-CD8a FITC-labeled molecule (eBioscience), biotinylated anti-mouse anti-CD62L L-selectine (Cedarlane) or biotinylated anti-mouse anti-CD44 (eBioscience). Washed cells were incubated with streptavidin Phycoerythrin conjugate (eBioscience) for 30 min at 4°C. As previously described, cells were fixed in a 70% ethanol solution, then washed three times with PBS 2% FCS and incubated in phosphate citrate buffer pH 7.8 for 30 min at room temperature. 10 μ L of 0.1% digitonin solution were added and incubated for an additional 30 min at room temperature, followed by the addition of 3 μ L of a RNase solution (1mg/mL) for a 30 min incubation at 37°C. The PBS 2% FCS washed cells were incubated with 2 μ g/mL 7AAD for 30 min at room temperature and analyzed with FACScan® for apoptosis detection (sub-G0).

Lymphocyte proliferative response assay with macrophage

In a 96-well flat-bottom tissue culture plate (Sarstedt, Montreal, QC, Canada) coated with an anti-TcR mAb (H57) (0.1 μ g/mL) (Jobin, 2000), 2.5×10^5 of isolated T lymphocytes and 2.0×10^4 of macrophages from the spleen of sham or burn mice were added in triplicate. To determine the potential of IL-2 to rescue the proliferation of T-cells, 12.5 U/mL of rIL-2 (Endogen) were added in each well before incubating the plates at 37°C for 69 h in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The cultures were next pulsed for an additional 3 h with 100 μ g/well of MTT (Sigma). MTT is converted into a dye by active mitochondrial deshydrogenase and that is solubilized by adding 200 μ L DMSO (Fisher Scientific). Absorbance of converted dye is measured at a wavelength of 570 nm with a background subtraction at 630-690 nm.

Statistical analysis

All data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (sem). Data were analyzed by Mann-Whitney U test or by ANOVA on *Graph Pad InStat* software program. Differences between groups were considered statically significant when the probability that they occurred by chance was less than 5%. Each experiment was performed twice or more to be considered significant.

RESULTS

Burn injury induces in vivo splenocyte depletion associated with an increase of their proliferation.

It is well documented that burn injury induces immune cell depletion and functional impairment of residual cells (27). In our model, which included burn injury and pain management, we determined the number of splenocytes in this state. As expected in Fig. 1A, the first day following the burn injury induced a drastic 50% cell decrease in the spleen that persists for 5 days. However at day 10 post-trauma, a cell recovery in the spleen was observed. Moreover the number of cells in this organ was significantly increased by around 40% as compared to the sham group. Thus burn injury, independently of pain management, has first induced splenocyte depletion followed by an expansion over control values.

The rapid decrease in spleen cell number after burn injury had been suggested an absence of splenocyte activation. To address this question, we have monitored cell proliferation by *in vivo* BrdU incorporation following burn injury (Fig. 1B). As shown in Fig. 1C, BrdU injection at the time of burn injury confirmed the absence of splenocyte proliferation after 24 h. BrdU injection at days 4 and 9 showed that splenocyte proliferation was persisted for up to 10 days following burn injury. Panel B in Fig. 1 demonstrates that the incorporation of BrdU was significantly higher in the burn group at day 5 and increased in magnitude in day 10. At day 5, sham's splenocyte cells had also incorporated BrdU but, the magnitude of incorporation was less important than in the burn group (Fig. 1B and 1C). BrdU incorporation in the sham group, receiving only buprenorphine, was observed at day 5 as compared to saline/sham group (Fig. 1B). This result was also observed when we monitored the *in vitro* splenocyte proliferation after T-cell mitogen stimulations (24). Overall, these results in Fig. 1A and 1B illustrated that burn injury caused rapid splenocyte depletion in the first 24h followed by an increase in cell proliferation.

Burn injury affects both CD4⁺ and CD8⁺ T- cells of the spleen.

As previously reported, functions of T-cells were affected following burn injury (8). We have analysed the relative and absolute ratio of CD4⁺- and CD8⁺-T-cells in the spleen following burn injury (Fig. 2A). When compared to the sham group, the relative of splenic CD4⁺ T-cells in burn group was slightly but significantly increased at day 1 post trauma ($p < 0.05$) followed by a decrease for up to 10 days following burn injury (Fig. 2A). At day 10, CD4⁺ T-cell population in injured animals was

decreased by around 50% when compared to the sham group. When the change in CD4⁺ T-cell population was evaluated in terms of absolute number of splenocytes, we noted a significant decrease of around 40% from days 1 to 5 (Fig. 2B and 2C, $p < 0.05$). At day 10, no changes in the absolute number of CD4⁺ T-cells were noted between sham and burn groups. Analysis of relative or absolute number of CD8⁺ T-cells in the spleen of burned mice, showed the same pattern and magnitude then those observed for CD4⁺ T-cells (Fig. 3A and 3B). Overall, analysis of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell populations show that the depletion of these cells after burn injury was not related to a specific sub-population of T lymphocytes in the spleen.

Changes in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells can be associated with their own naive cells.

Both CD4⁺ and CD8⁺ T-cell populations were decreased after burn injury. A diminution in the number of T-cells can be related to an increase of susceptibility to opportunistic infections as shown in several pathologies of the immune system (28). Moreover, elimination of naive or effector/memory cells can also be determinant in resistance of the host to infections (28). Using multi-parametric flow cytometry analysis, we have identified naive cells (CD4/CD8-CD62L^{high}CD44^{low}) and effector/memory cells (CD4/CD8-CD62L^{low}CD44^{high}) (Fig. 4B and 4C, Fig. 5B and 5C). One day after the burn injury, a relative increase in both CD4-CD62L^{high}-CD44^{low} and CD8-CD62L^{high}-CD44^{low} cells in the spleen was measured ($p < 0.05$, Fig. 4A and Fig. 5A). The initial naive T-cells increase was followed by a 50% decrease in these cells at day 5 and 10 post-burn ($p < 0.05$). The decrease of CD62L^{high}CD44^{low} cannot be related to phenotypic conversion in CD62L^{low}CD44^{high} (effector/memory) cells since no significant changes were observed for ten days following the burn injury in this last population (Fig. 4A and Fig. 5A).

To determine if the naive T-cells increase was associated with their activation, we have determined the expression of CD69, an early activation marker present on activated T-cells. Results indicated that the expression of CD69⁺ was in 5 to 20 % of T-cells after burn injury (data not shown). Ratio of T-cells expressing CD69⁺ from burned/sham mice in CD4-CD62L^{high}CD44^{low} T-cell population showed no changes upon day 5, followed by a significant 2 fold increase at day 10 (Fig. 6A, $p < 0.05$). Concerning effector/memory CD4⁺ T-cells (CD4-CD62L^{low}CD44^{high}) a 3.5 fold increase of cells bearing the CD69 molecule was observed at day 10 of the post-burn period (Fig. 6B, $p < 0.05$). For CD8⁺ T-cells, neither the CD8-CD62L^{high}CD44^{low} or CD8-CD62L^{low}CD44^{high} express a different level of CD69⁺, indicating that these cells were not activated in the spleen after burn injury (Fig. 6D and 6E). In the light of these present results, in burn injured mice, CD4⁺ T lymphocytes were activated at

a late period (day 10) in secondary immune organs, but not immediately following burn injury (day 1 and 5). Activated cells were distributed between naive and effector population in CD4⁺ T-cells. Interestingly, no changes were noted between sham and burn group regarding the expression of the early activation marker CD8⁺ in T-cells.

T-cell apoptosis after burn injury persists for 10 days following injury.

Our results show a decrease in the splenocyte number the day following injury. This initial depletion was followed by a progressive increase until day 10. The decrease of immune cell populations post-burn injury can be associated to a release of stress mediators such as TNF- α , Fas-L and glucocorticoids (17,18). Thus, we investigated the susceptibility of splenic T-cells to be depleted by apoptosis immediately and after burn injury. T-cells from both sham and burn groups were purified by macrophages and B cell depletion. A 90% T-cell purification was obtained from the spleen cells of each group. Purified cells were thereafter incubated in normal culture media for 12 h and analysed for their susceptibility to apoptosis. Results at day 1 following burn injury demonstrated an increase of apoptosis in the burn group (Fig. 7A, lane 1: sham, lane 3: burn). Presence of apoptotic cells can also be detected in the sham group and can be related to the stress induced by surgical manipulations. At day 10, apoptosis in the sham group is under the limit of detection of the used method. (Fig. 7A, lane 1). In T-cells isolated from the burn group, a significant increase of cells in apoptosis was present. We also have determined if the stimulation of T-cells, with an anti-TcR mAb, from sham and burn groups could be associated with an increase of apoptosis. At day 1, stimulation with coated anti-TcR mAb of T-cells of burned animals caused no change in apoptosis (Fig. 7A lane 2: sham lane 4: burn). However, at day 10 we detected an increase of apoptosis (Fig. 7A lane 2: sham, lane 4: burn), indicating that T-cells activation by TcR can result in apoptosis rather than their proliferation.

Purified spleen cells from sham or burned mice contained both CD4⁺ and CD8⁺ T-cells, were analyzed by flow cytometry assays for the presence of apoptotic cells in both populations, by determining the sub-G0 population on gated cells. At day 1 following burn injury, we observed a significant decrease of apoptotic cells between each group in total CD4⁺ T-cells, CD4-CD62L^{high}CD44^{low} or CD4-CD62L^{low}CD44^{high} (Fig. 7B). Similar results were obtained for CD8⁺ T-cells and CD8-CD62L^{high}CD44^{low} or CD8-CD62L^{low}CD44^{high} (Fig. 7B). Changes observed with laddering experiments on total T-cells population can be due to cells expressing medium levels of markers used to discriminate naïve and effector/memory cells. 10 days following burn injury, results pointed out CD4⁺ T-cells as the major cells susceptible to apoptosis (Fig. 7C). Cells with phenotype

corresponding to naive CD4 T-cells ($CD4-CD62L^{high}CD44^{low}$) were more susceptible to apoptosis than other cell populations. $CD8^{+}$ T-cells from injured animals showed a comparable level of apoptosis between sham mice and burn mice (Fig. 7C). Overall, our results showed that $CD4^{+}$ T-cells were most affected at long term after burn injury and the naive T-cells population seem greatly affected.

T-cell activation after burn injury was perturbed independently of macrophage function.

Several reports associated the T-cell dysfunctions after burn injury to macrophage activation or dysfunction (29-31). To determine the importance of macrophages in T-cells dysfunctions after burn injury we have stimulated purified T-cells in presence of macrophages obtained from the sham or the burn groups 10 days following injury. The macrophage population was reduced by 50 % 1 to 5 days following burn injury (Fig. 8A). Between days 5 to 10, the macrophage population increased rapidly to reach about 4 times the normal value in the spleen of burned mice. Stimulation of purified T-cells from burned mice in presence of macrophages isolated from sham animals showed a significant decrease of proliferation, demonstrating that normal macrophages cannot rescue T-cells activation from burned animals (Fig. 7B). On the other hand, stimulation of T-cells from both groups in presence of macrophages obtained from burned animals failed to support normal activation (Fig. 7B). Stimulation of T-cells in presence of exogenous IL-2 and macrophages from not injured mice confirms the dysfunction of T-cells (Fig. 7C). Indeed, an increase of cell proliferation was noted only from T-cells obtained from sham mice stimulated in presence of sham macrophages. Thus, burn injury directly affects T-cells as shown by the absence of stimulation in presence of sham macrophages. However, the role of macrophages in T-cells dysfunction after burn injury was also confirmed since purified T-cells from the sham group cannot be normally activated in presence of macrophages isolated from the spleen of burned animals.

DISCUSSION

Burn injury leads to the perturbation of several systems, including the immune system. Previous studies have previously established that severe burn induces a spleen T-cell function impairment with the maximal effect observed at day 10 following burn (24-25,32-35). Macrophages as well as B and T-cell populations decreased following burn injury (24,36-37). In the present work, we showed that burn injury causes rapid spleen cell depletion within the first 5 days following injury. In the later post-burn period, a splenocyte increase was noted. The results on BrdU incorporation indicated an increase of cycling mature lymphocytes in burned mice spleen. BrdU injection 24 h before determining its incorporation at different times post-burn injury gave us the possibility to define the apparent kinetics of spleen cycling cells. A significant number of cycling cells can be observed throughout days 2 to 10. Thus, two major findings emerge from our data: first, burn injury causes rapid spleen cell depletion by apoptosis and second, a proportion of the remaining cells in the spleen pursues its proliferation.

Initial spleen cell depletion can be explained by either a cell migration increase to burn wound or by apoptosis induction. Lawrence *et al.* show a 5 fold T-cell increase in draining lymph nodes (DLN) the burn wound after dorsal and ventral full-thickness injuries (39). However, the analysis showed that the only modification in DLN was observed at day ten according to our model (data not shown). Induction of apoptosis can explain the loss of splenocytes following burn injury. Structural analysis showed that the splenic white pulp was still atrophic with a B and T lymphocyte decrease 24 h post-injury (30), confirming the induction of apoptosis in this organ. Similar results were also obtained in the thymus (18,19,40). Within 3 hours post-injury, burn induced apoptosis in the spleen and the thymus by an increased caspase-3 activation (30,40). Apoptosis induction after thermal injury in secondary lymphoid organs was dependent on endogenous glucocorticoid release since pre-treatment of mice with mifepristone significantly reduced apoptosis (17,18). It was also suggested that other factors such as an endotoxin increase, FasL signalling or TGF- β could be involved (16,17,19,20,41).

Although spleen cell numbers were decreased, BrdU experiments showed the presence of cycling splenocytes. Days following injury, electron microscopy studies also showed the presence of large blastic cells and mitotic figures in the spleen (30). However, the nature of these cycling cells was not determined. Analysis of T-cell populations demonstrates a relative increase of CD4⁺ or CD8⁺ during the first day following the injury. Later, a relative decrease of these two T-cell populations was noted. Considering the absolute spleen cell number, the conclusion is different. A reduction of

around 50% of either CD4⁺ or CD8⁺ T-cells was noted within the first 5 days after burn injury and this was followed by a return to normal values at day 10. Apoptosis of T-cells in peripheral immune organs was confirmed by our results on T-cells and also by other studies (17, 42). On the other hand, the migration of CD4⁺ T-cells near the burn wound was also reported (39). Our analysis of wound DLN as compared to non-draining LN confirmed an increase in T-cell number within days 5 to 10 (data not shown). Thus, changes in the spleen T-cell sub-populations of burned mice can be due to migration and apoptosis.

T lymphocytes are key players for the initiation of most responses of the specific immune system (43). The peripheral T-cell pool is highly heterogeneous, consisting of multiple sub-populations. Peripheral T-cells can be in one of three states : naive, effector or memory state (44-46, 48). T-cell homeostasis is crucial to maintain the host protection against infections as demonstrated in different pathologies (49-50). We sought to extent findings with our burned mice model by analyzing naive and memory CD4⁺ or CD8⁺ T-cells. We observed at day 1 after burn injury, a naive cell (CD62L^{high}CD44^{low}) increase in the T-cell population followed by their decrease at day 5, independantly to the T-cell sub-populations. On the other hand, memory CD4⁺ or CD8⁺ T-cells (CD62L^{low}CD44^{high}) decreased only at day 10 following injury. Overall, these results indicated that burn injury affects all T-cell states after burn injury. However, when we have determined the expression of early activation maker namely CD69, only CD4⁺CD62L^{high}CD44^{low} and CD4⁺CD62L^{low}CD44^{high} were activated when compared to sham mice. The presence of these activated cells can only be detected at day 10 after injury.

The question now is to know if these results make sense in the burn injury context and T-cell homeostasis. Burn injury induces the production of several cytokines such as IL-1, TNF- α , IL-4, IL-6, TGF- β and INF- γ (32,51-53). Among these cytokines, some were identified to play a role in CD4⁺ or CD8⁺ T-cell homeostasis (54). For example, it was demonstrated that burn injury augmented INF- γ production by naive CD4⁺ transgenic T-cells (55). INF- γ increase was also associated with CD8⁺ T-cell homeostasis (48). Moreover, burn injury also induces hormonal changes such as glucocorticoids which can influence T-cell homeostasis (17,56). Finally, burn injury causes an increase of self-antigen or bacterial antigen in circulation and thus can potentially influence T-cell activation and their homeostasis (20,57-59). Besides, a drastic macrophage increase in the spleen can possibly facilitate T-cell activation. Studies on splenic macrophages showed a defective antigen presentation early after burn injury (60). Overall, burn injury induces an environment that can influence T-cell homeostasis.

We cannot however delineate specific and bystander response of T-cells in our model. Increase of CD69 on both naive and effector/memory CD4⁺ T-cells favours antigen activation. Indeed, when CD4⁺ T-cells encounter an antigen, they turn from naive CD44^{low} CD62L^{high} CD69⁺ phenotype to activated CD44^{high} CD62L^{low} CD69⁺ phenotype. This phenotypic change can also explain the decrease of effector/memory cells by their migration to inflammation sites. Effector cells express a high B₂ integrins level and thus preferentially migrate to inflammatory tissues via extravasation through inflammatory endothelium expressing appropriate ligands, i.e. intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1).

The major change in T-cell homeostasis after burn injury occurs 10 days later. As it corresponds to the time when major perturbations of the immune system was reported (24,32-35). Using purified T-cells, we observed a spontaneous apoptosis increase even after an anti-TcR stimulation. Analysis of T-cell sub-populations showed that cells with high levels of CD44, described as effector/memory T-cells, are more resistant to apoptosis (43,44,61). This resistance can be related to a higher *bcl-2* level in CD8⁺ memory T-cells. Also, it was observed that the CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subset expansion can be produced not only by cell proliferation induction but also by death preventing (62). Up-regulation of anti-apoptotic gene products including *c-FLIP*, *bcl-xl* and *bcl-2* could be responsible for the reduction of T-cell death.

It is not clear if burn injury affects directly or not T-cells by an accessory cell production of deleterious molecules. We have determined that T-cells are directly affected at day 10 following burn injury and that the addition of recombinant IL-2 could not restore T-cell activation. However in man, the defective signalling T-cells could be rescued by the addition of IL-2 (63). Burn induces a depressed T-cell activation at several levels, including the IL-2 gene transcription by inhibiting *c-fos* expression (64), by decreasing the expression level and activity of IL-2R (67,68) or by perturbing the general cell signalling (65, 66). However, spleen macrophages were also responsible for the non-responsiveness of T-cells. Macrophages can perturb T-cell activation by producing PGE2 which can affect NFAT and AP-1 (15, 69).

In adults with steady-state conditions, the number and the distribution of lymphocyte populations are under homeostatic control. Burn injury perturbs the homeostasis by changing hormonal control, creating an environment that can modulate T-cell populations and functions. Our results pointed out CD4⁺ T-cells as the most affected cells. The presence of naive and effector/memory CD4⁺ T activated cells 10 days following thermal injury suggests that these cells are effectively primed as previously

demonstrated in other models (52). Those primed cells could be more susceptible to apoptosis. Thus, multifactorial modulations of T lymphocyte functions, following burn injury, led to the disruption of the homeostatic control which could explain sepsis or infection increase.

REFERENCES

1. Ninnemann, J. L. 1987. Trauma, sepsis, and the immune response. *J Burn Care Rehabil* 8:462-8.
2. Barlow, Y. 1994. T lymphocytes and immunosuppression in the burned patient: a review. *Burns* 20:487-90.
3. Schluter, B., W. Konig, M. Koller, G. Erbs, and F. E. Muller. 1990. Studies on B-lymphocyte dysfunctions in severely burned patients. *J Trauma* 30:1380-9.
4. Schluter, B., W. Konig, M. Koller, G. Erbs, and F. E. Muller. 1991. Differential regulation of T- and B-lymphocyte activation in severely burned patients. *J Trauma* 31:239-46.
5. Alexander, J. W. and J. A. Moncrief. 1967. Immunologic phenomena in burn injuries. *JAMA* 199:257-60.
6. Gennari, R. and J. W. Alexander. 1995. Anti-interleukin-6 antibody treatment improves survival during gut- derived sepsis in a time-dependent manner by enhancing host defense. *Crit Care Med* 23:1945-53.
7. Dalton, H. J. 2001. T-cell responses in burn infection. *Crit Care Med* 29:2386-7.
8. Teodorczyk-Injeyan, J. A., B. G. Sparkes, G. B. Mills, W. J. Peters, and R. E. Falk. 1986. Impairment of T cell activation in burn patients: a possible mechanism of thermal injury-induced immunosuppression. *Clin Exp Immunol* 65:570-81.
9. Jobin, N., D. Garrel, and J. Bernier. 2000. Increased serum-soluble interleukin-2 receptor in burn patients: characterization and effects on the immune system. *Hum Immunol* 61:233-46.
10. Teodorczyk-Injeyan, J. A., B. G. Sparkes, G. B. Mills, and W. J. Peters. 1991. Soluble interleukin 2-receptor alpha secretion is related to altered interleukin 2 production in thermally injured patients. *Burns* 17:290-5.
11. O'Suilleabhain, C. B., S. Kim, M. R. Rodrick, J. A. Mannick, and J. A. Lederer. 2001. Injury induces alterations in T-cell NFkappaB and AP-1 activation. *Shock* 15:432-7.
12. O'Sullivan, S. T., J. A. Lederer, A. F. Horgan, D. H. Chin, J. A. Mannick, and M. L. Rodrick. 1995. Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Ann Surg* 222:482-90; discussion 490-2.
13. Cairns, B. A., R. Maile, I. Buchanan, D. Pilati, S. DeSerres, E. J. Collins, J. A. Frelinger, and A. A. Meyer. 2001. CD8 (+) T cells express a T-helper 1-like phenotype after burn injury. *Surgery* 130:210-6.
14. Choudhry, M. A., N. Fazal, S. Y. Namak, F. Haque, T. Ravindranath, and M. M. Sayeed. 2001. PGE2 suppresses intestinal T cell function in thermal injury: a cause of enhanced bacterial translocation. *Shock* 16:183-8.
15. Choudhry, M. A., H. Mao, F. Haque, M. Khan, N. Fazal, and M. M. Sayeed. 2002. Role of

- NFAT and AP-1 in PGE2-mediated T cell suppression in burn injury. *Shock* 18:212-6.
16. Ayala, A., C. S. Chung, Y. X. Xu, T. A. Evans, K. M. Redmond, and I. H. Chaudry. 1999. Increased inducible apoptosis in CD4+ T lymphocytes during polymicrobial sepsis is mediated by Fas ligand and not endotoxin. *Immunology* 97:45-55.
 17. Fukuzuka, K., C. K. Edwards 3rd, M. Clare-Salzer, E. M. Copeland 3rd, L. L. Moldawer, and D. W. Mozingo. 2000. Glucocorticoid and Fas ligand induced mucosal lymphocyte apoptosis after burn injury. *J Trauma* 49:710-6.
 18. Fukuzuka, K., C. K. Edwards 3rd, M. Clare-Salzer, E. M. Copeland 3rd, L. L. Moldawer, and D. W. Mozingo. 2000. Glucocorticoid-induced, caspase-dependent organ apoptosis early after burn injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:R1005-18.
 19. Hobson, K. G., K. Cho, L. K. Adamson, and D. G. Greenhalgh. 2002. Burn-induced thymic apoptosis corresponds with altered TGF-beta(1) and Smad 2/3. *J Surg Res* 105:4-9.
 20. Xia, P. Y., J. Zheng, H. Zhou, W. D. Pan, X. J. Qin, and G. X. Xiao. 2002. Relationship between lymphocyte apoptosis and endotoxin translocation after thermal injury in rats. *World J Gastroenterol* 8:546-50.
 21. Hargreaves, R. G., N. J. Borthwick, M. S. Montani, E. Piccolella, P. Carmichael, R. I. Lechler, A. N. Akbar, and G. Lombardi. 1997. Induction of apoptosis following antigen presentation by T cells: anergy and apoptosis are two separate phenomena. *Transplant Proc* 29:1102-4.
 22. Mountz, J. D., T. Zhou, J. Wu, W. Wang, X. Su, and J. Cheng. 1995. Regulation of apoptosis in immune cells. *J Clin Immunol* 15:1-16.
 23. Altman, J. D., P. A. Moss, P. J. Goulder, D. H. Barouch, M. G. McHeyzer-Williams, J. I. Bell, A. J. McMichael, and M. M. Davis. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274:94-6.
 24. Jobin, N., D. R. Garrel, and J. Bernier. 2000. Increased burn-induced immunosuppression in lipopolysaccharide-resistant mice. *Cell Immunol* 200:65-75.
 25. Jobin, N., D. R. Garrel, J. Champoux, and J. Bernier. 2000. Improved immune functions with administration of a low-fat diet in a burn animal model. *Cell Immunol* 206:71-84.
 26. Vasseur, F., A. Le Campion, J. H. Pavlovitch, and C. Penit. 1999. Distribution of Cycling T Lymphocytes in Blood and Lymphoid Organs During Immune Responses. *J. Immunology*, vol. 162, no. 9, p. 5164-72.
 27. Sparkes, B. G. 1993. Mechanisms of immune failure in burn injury. *Vaccine* 11:504-10.
 28. Laurence, J. 1995. CD4+ and CD8+ T lymphocyte activation in HIV infection. Implications for immune pathogenesis and therapy. *Adv Exp Med Biol* 374:1-15.
 29. Kupper, T. S., D. R. Green, S. K. Durum, and C. C. Baker. 1985. Defective antigen presentation to a cloned T helper cell by macrophages from burned mice can be restored with interleukin-1. *Surgery* 98:199-206.

30. Maekawa, T., H. Kajihara, K. Okabayashi, M. Otani, and O. Yuge. 2002. Impairment of splenic B and T lymphocytes in the early period after severe thermal injury: immunohistochemical and electron microscopic analysis. *Burns* 28:329-39.
31. Schwacha, M. G., A. Ayala, W. G. Cioffi, K. I. Bland, and I. H. Chaudry. 1999. Role of protein kinase C in cyclic AMP-mediated suppression of T- lymphocyte activation following burn injury. *Biochim Biophys Acta* 1455:45-53.
32. Durbin, E. A., M. S. Gregory, K. A. Messingham, C. V. Fontanilla, L. A. Duffner, and E. J. Kovacs. 2000. The role of interleukin 6 in interferon-gamma production in thermally injured mice. *Cytokine* 12:1669-75.
33. Horgan, A. F., M. V. Mendez, D. S. O'Riordain, R. G. Holzheimer, J. A. Mannick, and M. L. Rodrick. 1994. Altered gene transcription after burn injury results in depressed T- lymphocyte activation. *Ann Surg* 220:342-51; discussion 351-2.
34. Mistry, S., N. F. Mistry, N. H. Antia, and S. Arora. 1986. Cellular immune mechanisms in thermally injured mice. *Burns Incl Therm Inj* 12:188-92.
35. Moss, N. M., D. B. Gough, A. L. Jordan, J. T. Grbic, J. J. Wood, M. L. Rodrick, and J. A. Mannick. 1988. Temporal correlation of impaired immune response after thermal injury with susceptibility to infection in a murine model. *Surgery* 104:882-7.
36. Burlcson, D. G., G. K. Vaughn, A. D. Mason Jr, and B. A. Pruitt Jr. 1987. Flow cytometric measurement of rat lymphocyte subpopulations after burn injury and burn injury with infection. *Arch Surg* 122:216-20.
37. Hansbrough, J. F. and M. A. Gadd. 1989. Temporal analysis of murine lymphocyte subpopulations by monoclonal antibodies and dual-color flow cytometry after burn and nonburn injury. *Surgery* 106:69-80.
38. Hansbrough, J. F., R. L. Zapata-Sirvent, E. J. Bartle, J. K. Anderson, L. Elliott, M. A. Mansour, and W. H. Carter. 1985. Alterations in splenic lymphocyte subpopulations and increased mortality from sepsis following anesthesia in mice. *Anesthesiology* 63:267-73.
39. Lawrence, M. H., H. F. de Riesthal, and S. E. Calvano. 1996. Changes in memory and naive CD4+ lymphocytes in lymph nodes and spleen after thermal injury. *J Burn Care Rehabil* 17:1-6.
40. Nakanishi, T., Y. Nishi, E. F. Sato, M. Ishii, T. Hamada, and M. Inoue. 1998. Thermal injury induces thymocyte apoptosis in the rat. *J Trauma* 44:143-8.
41. Kell, M. R., O. Shelley, J. A. Mannick, Z. Guo, and J. A. Lederer. 2000. A central role for CD95 (Fas) in T-cell reactivity after injury. *Surgery* 128:159-64.
42. Ayala, A., C. S. Chung, Y. X. Xu, T. A. Evans, K. M. Redmond, and I. H. Chaudry. 1999. Increased inducible apoptosis in CD4+ T lymphocytes during polymicrobial sepsis is mediated by Fas ligand and not endotoxin. *Immunology* 97:45-55.
43. Van Parijs, L. and A. K. Abbas. 1998. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 280:243-8.

44. Sprent, J. 1993. Lifespans of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 5:433-8.
45. Sprent, J. 1999. Presidential address to the American Association of Immunologists. Stimulating naive T cells. *J Immunol* 163:4629-36.
46. Tough, D. F. and J. Sprent. 1994. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J Exp Med* 179:1127-35.
47. Tough, D. F. and J. Sprent. 1995. Lifespan of lymphocytes. *Immunol Res* 14:1-12.
48. Tough, D. F. and J. Sprent. 1995. Life span of naive and memory T cells. *Stem Cells* 13:242-9.
49. Desbarats, J., T. Wade, W. F. Wade, and M. K. Newell. 1999. Dichotomy between naive and memory CD4(+) T cell responses to Fas engagement. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:8104-9.
50. Westermann, J., E. M. Ehlers, M. S. Exton, M. Kaiser, and U. Bode. 2001. Migration of naive, effector and memory T cells: implications for the regulation of immune responses. *Immunol Rev* 184:20-37.
51. Castagnoli, C., C. Trombotto, S. Ariotti, M. Millesimo, D. Ravarino, G. Magliacani, A. N. Ponzi, M. Stella, S. Teich-Alasia, F. Novelli, and T. Musso. 1999. Expression and role of IL-15 in post-burn hypertrophic scars. *J Invest Dermatol* 113:238-45.
52. Goebel, A., E. Kavanagh, A. Lyons, I. B. Saporoschetz, C. Soberg, J. A. Lederer, J. A. Mannick, and M. L. Rodrick. 2000. Injury induces deficient interleukin-12 production, but interleukin-12 therapy after injury restores resistance to infection. *Ann Surg* 231:253-61.
53. Kavanagh, E. G., J. L. Kelly, A. Lyons, C. C. Soberg, J. A. Mannick, and J. A. Lederer. 1998. Burn injury primes naive CD4+ T cells for an augmented T-helper 1 response. *Surgery* 124:269-76; discussion 276-7.
54. Surh, C. D. and J. Sprent. 2002. Regulation of naive and memory T-cell homeostasis. *Microbes Infect* 4:51-6.
55. Kell, M. R., E. G. Kavanaugh, A. Goebel, C. C. Soberg, and J. A. Lederer. 1999. Injury primes the immune system for an enhanced and lethal T-cell response against bacterial superantigen. *Shock* 12:139-44.
56. Calvano, S. E., J. D. Albert, A. Legaspi, B. C. Organ, K. J. Tracey, S. F. Lowry, G. T. Shires, and A. C. Antonacci. 1987. Comparison of numerical and phenotypic leukocyte changes during constant hydrocortisone infusion in normal humans with those in thermally injured patients. *Surg Gynecol Obstet* 164:509-20.
57. Sparkes, B. G. 1991. Influence of burn-induced lipid-protein complex on IL2 secretion by PBMC *in vitro*. *Burns* 17:128-35.
58. Sparkes, B. G., J. W. Gyorkos, R. M. Gorczynski, and A. J. Brock. 1990. Comparison of endotoxins and cutaneous burn toxin as immunosuppressants. *Burns* 16:123-7.
59. Teodorczyk-Injeyan, J. A., M. Cembrzynska-Nowak, and W. J. Peters. 1993. Thermal injury-associated neopterin production: regulation by interleukin-2. *J Burn Care Rehabil* 14:617-23.

60. Kupper, T. S., D. R. Green, S. K. Durum, and C. C. Baker. 1985. Defective antigen presentation to a cloned T helper cell by macrophages from burned mice can be restored with interleukin-1. *Surgery* 98:199-206.
61. Grayson, J. M., L. E. Harrington, J. G. Lanier, E. J. Wherry, and R. Ahmed. 2002. Differential sensitivity of naive and memory CD8⁺ T cells to apoptosis *in vivo*. *J Immunol* 169:3760-70.
62. Davila, E., M. G. Velez, C. J. Heppelmann, and E. Celis. 2002. Creating space: an antigen-independent, CpG-induced peripheral expansion of naive and memory T lymphocytes in a full T-cell compartment. *Blood* 100:2537-45.
63. Gough, D. B., N. M. Moss, A. Jordan, J. T. Grbic, M. L. Rodrick, and J. A. Mannick. 1988. Recombinant interleukin-2 (rIL-2) improves immune response and host resistance to septic challenge in thermally injured mice. *Surgery* 104:292-300.
64. Horgan, A. F., M. V. Mendez, D. S. O'Riordain, R. G. Holzheimer, J. A. Mannick, and M. L. Rodrick. 1994. Altered gene transcription after burn injury results in depressed T- lymphocyte activation. *Ann Surg* 220:342-51; discussion 351-2.
65. Horton, J. W., J. White, and D. Maass. 1998. Protein kinase C inhibition improves ventricular function after thermal trauma. *J Trauma* 44:254-64; discussion 264-5.
66. Sayeed, M. M. 2000. Signaling mechanisms of altered cellular responses in trauma, burn, and sepsis: role of Ca²⁺. *Arch Surg* 135:1432-42.
67. Ferrara, J. J., R. D. Peterson, R. Hester, A. Luterman, and P. W. Curreri. 1989. Inhibition of lymphocyte blastogenesis caused by suppression of interleukin-2 receptor sites after thermal injury. *J Burn Care Rehabil* 10:119-24.
68. Gadd, M. A., J. F. Hansbrough, D. B. Hoyt, and N. Ozkan. 1989. Defective T-cell surface antigen expression after mitogen stimulation. An index of lymphocyte dysfunction after controlled murine injury. *Ann Surg* 209:112-8.
69. Faist, E., C. Schinkel, S. Zimmer, J. P. Kremer, S. Alkan, C. Rordorf, H. von Donnersmarck, and F. W. Schildberg. 1993. The influence of major trauma on the regulatory levels of interleukin-1 (IL-1) and IL-2 in human mononuclear leukocytes. *Zentralbl Chir* 118:420-31.

Legend of figures

Figure 1: Burn injury induces *in vivo* splenocyte depletion following by an increase of splenocyte proliferation. The spleen cellularity was measured on day 1, 5 and 10 post-injury of both buprenorphine sham group and buprenorphine burn group (A). Cell viability was determined by trypan blue exclusion. The results are expressed as mean of spleen cellularity in a five mice group. For splenocyte proliferation, BrdU was twice injected (15 and 1 h before sacrifice day) into both groups for each experimental day. Splenocytes were harvested 60 minutes after the second BrdU injection. BrdU was then detected on fixed and permeabilized cells, with an anti-BrdU-FITC Ab (B). The results are expressed as mean percentages of BrdU⁺ cells in the spleens of saline sham, buprenorphine sham group and buprenorphine burn group within a five mice group (C). * Indicates $p < 0.05$ for buprenorphine burn vs buprenorphine sham mice.

Figure 2: CD4⁺ T-cell populations in the spleen are affected by thermal injury. Splenocytes were stained with an anti-CD4⁺-FITC Ab (A) on day 1, 5 and 10 post-burn injury and were analyzed by flow cytometry to evaluate the expression levels of CD4⁺ T-cell population (B). Absolute numbers of CD4⁺ (C) T-cells in the spleen were calculated for buprenorphine-sham group and buprenorphine-burn group 1, 5 and 10 days post-burn injury. Data are expressed as mean percentage in a five mice group. * Indicates $p < 0.05$ for buprenorphine-burn vs buprenorphine-sham mice

Figure 3: CD8⁺ T-cell populations in the spleen are also affected by thermal injury. Splenocytes were stained with an anti-CD8⁺-FITC Ab (A) on day 1, 5 and 10 post-burn injury and were analyzed by flow cytometry to evaluate the expression levels of CD8⁺ T-cell population (B). Absolute numbers of CD8⁺ (C) T-cells in the spleen were calculated for both buprenorphine-sham group and buprenorphine-burn group 1, 5 and 10 days post-burn injury. Data are expressed as mean percentage in a five mice group. * Indicates $p < 0.05$ and ** indicates $p < 0.01$ for buprenorphine-burn vs buprenorphine-sham mice

Figure 4: Burn injury alters CD4⁺ naive and effector/memory T-cell expression in the spleen. Splenocytes were stained for the expression of CD4 naive (CD62L^{high}CD44^{low}) vs effector (CD62L^{low}CD44^{high}) (C) T-cell expression 1, 5 and 10 days after burn injury. CD4⁺ T-cells were gated in spleen lymphocyte populations and the percentage of CD62L^{high}CD44^{low} (A) and CD62L^{low}CD44^{high} (B) cells were determined, for both buprenorphine-sham group and

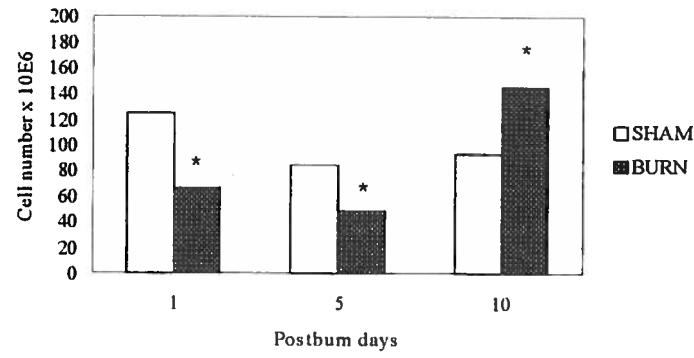
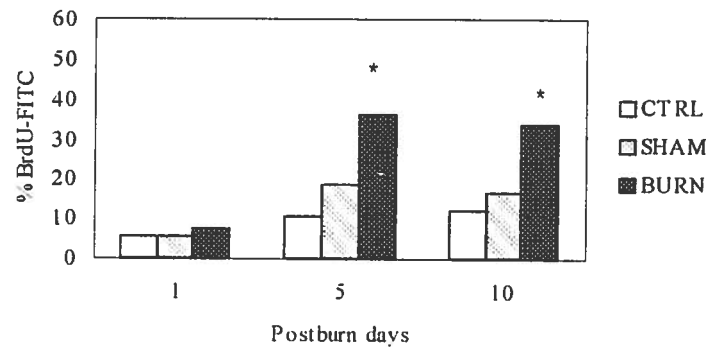
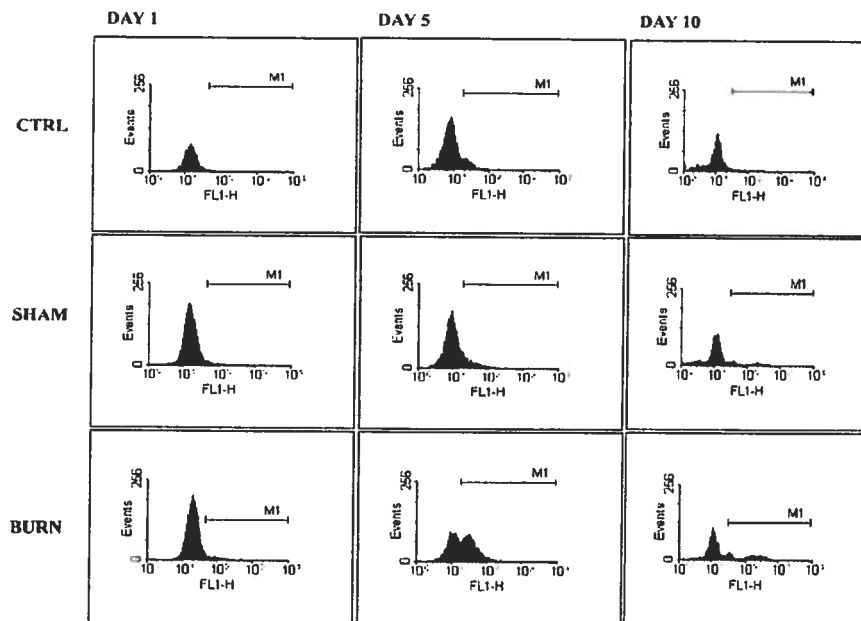
buprenorphine-burn group. Each result was obtained from a five mice group. * Indicates $p < 0.05$ for buprenorphine-burn vs buprenorphine-sham mice.

Figure 5: Burn injury alters CD8⁺ naive and effector/memory T-cell expression in the spleen. Splenocytes were stained for the expression of CD8⁺ naive (CD62L^{high}CD44^{low}) vs effector (CD62L^{low}CD44^{high}) (C) T-cell expression 1, 5 and 10 days after burn injury. CD8⁺ T-cells were gated in spleen lymphocyte populations and the percentage of CD62L^{high}CD44^{low} (A) and CD62L^{low}CD44^{high} (B) cells were determined, for both buprenorphine-sham group and buprenorphine-burn group. Each result was obtained from a five mice group. * Indicates $p < 0.05$ for buprenorphine-burn vs buprenorphine-sham mice.

Figure 6: Burn injury activates (CD69⁺) both CD4⁺ naïve and effector/memory. Splenocytes were stained for the CD69⁺ expression, an early activation marker, for each T-cell populations. Activated CD4⁺ naive (CD62L^{high}CD44^{low}) (A) vs effector (CD62L^{low}CD44^{high}) T-cells (B) were detected, on days 1, 5 and 10 after burn injury. Expression of CD8 naive (C) vs effector (D) activated T-cells was also detected in the spleen of each experimental day after thermal injury. CD4⁺ and CD8⁺ cells were gated in the spleen lymphocyte population and the proportions of activated CD69⁺ CD62L^{high}CD44^{low} and CD62L^{low}CD44^{high} were determined, for both buprenorphine-sham group and buprenorphine-burn group. Each result was obtained from a five mice group and ratio results from buprenorphine burn group on buprenorphine sham group. * Indicates $p < 0.05$ for buprenorphine-burn vs buprenorphine-sham mice.

Figure 7: Naive CD4⁺ T-cell apoptosis persists 10 days after thermal injury. T-cells were isolated from spleen and incubated with or without coated anti-TcR mAb (0.1μg/mL H57) for 12 hours, on day 1 and 10 after thermal injury. DNA was extracted and internucleosomal cleavage visualized on a 1.5% agarose gel ((A) lane 1:sham ; lane 2:sham + H57 ; lane 3:burn ; lane 4:burn + H57). Lymphocytes were stained for each lymphocyte populations; CD4⁺, CD8⁺, naive (CD62L^{high}CD44^{low}) vs effector (CD62L^{low}CD44^{high}) 1 (B) and 10 days (C) after burn injury, for both buprenorphine-sham group and buprenorphine-burn group. T-cell apoptosis was detected and quantified by three-color flow cytometry by 7-amino-actinomycin D staining (B and C).

Figure 8: T-cell activation after burn injury was perturbed independently of macrophage functions. Splenocytes were stained for macrophage expression using F4/80 mAb 1, 5, and 10 days after thermal injury, for both buprenorphine-sham group and buprenorphine-burn group (A). At day 10, lymphocytes, from both buprenorphine-sham group and buprenorphine-burn group, and also macrophages were isolated from spleen and were incubated under standard conditions for 69 h, and pulsed for an additional 3 h with MTT (B and C). Data are expressed as mean percentage in a five mice group. * Indicates $p < 0.05$ and *** Indicates $p < 0.01$ for buprenorphine-burn vs buprenorphine-sham mice.

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

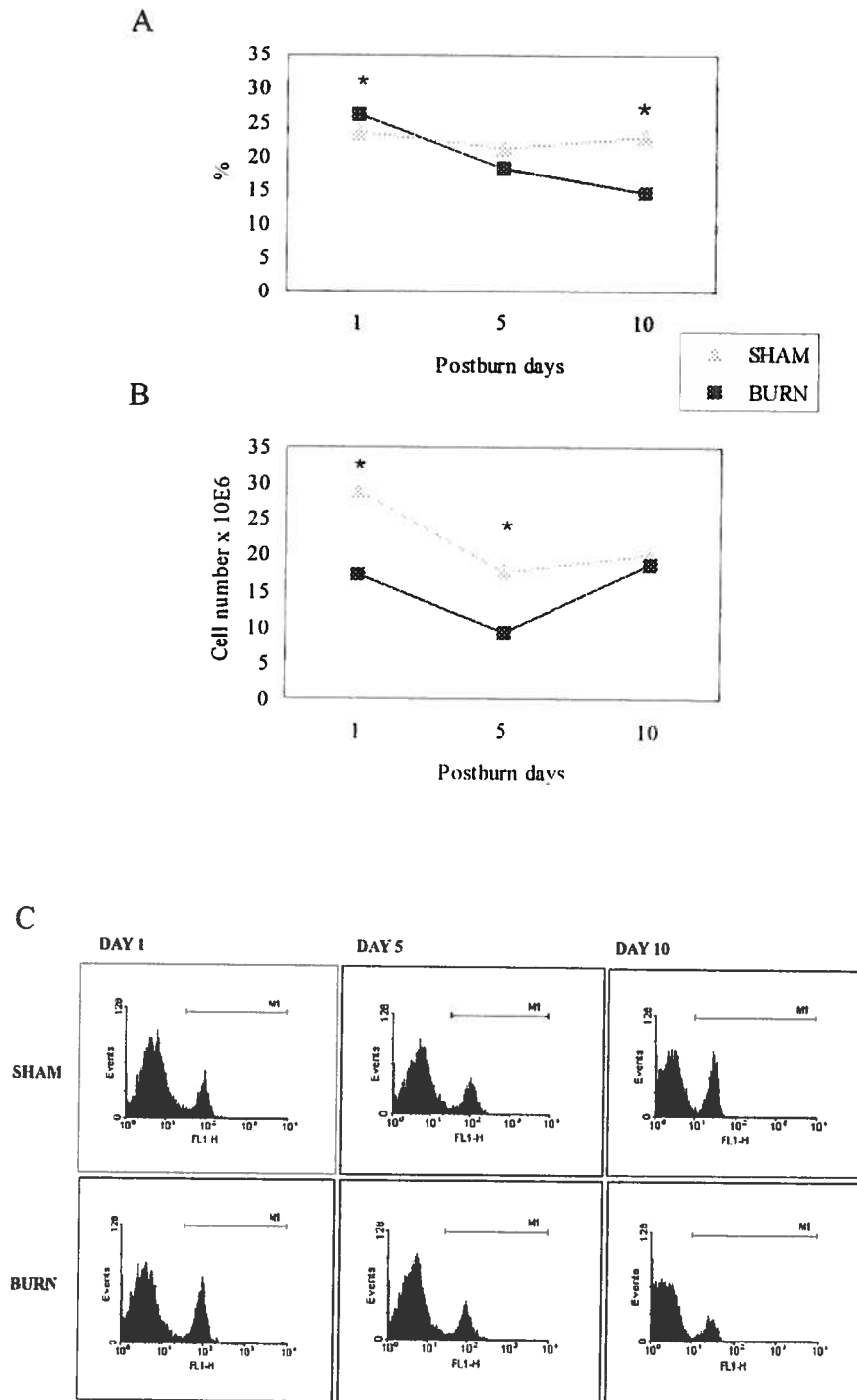


Figure 2

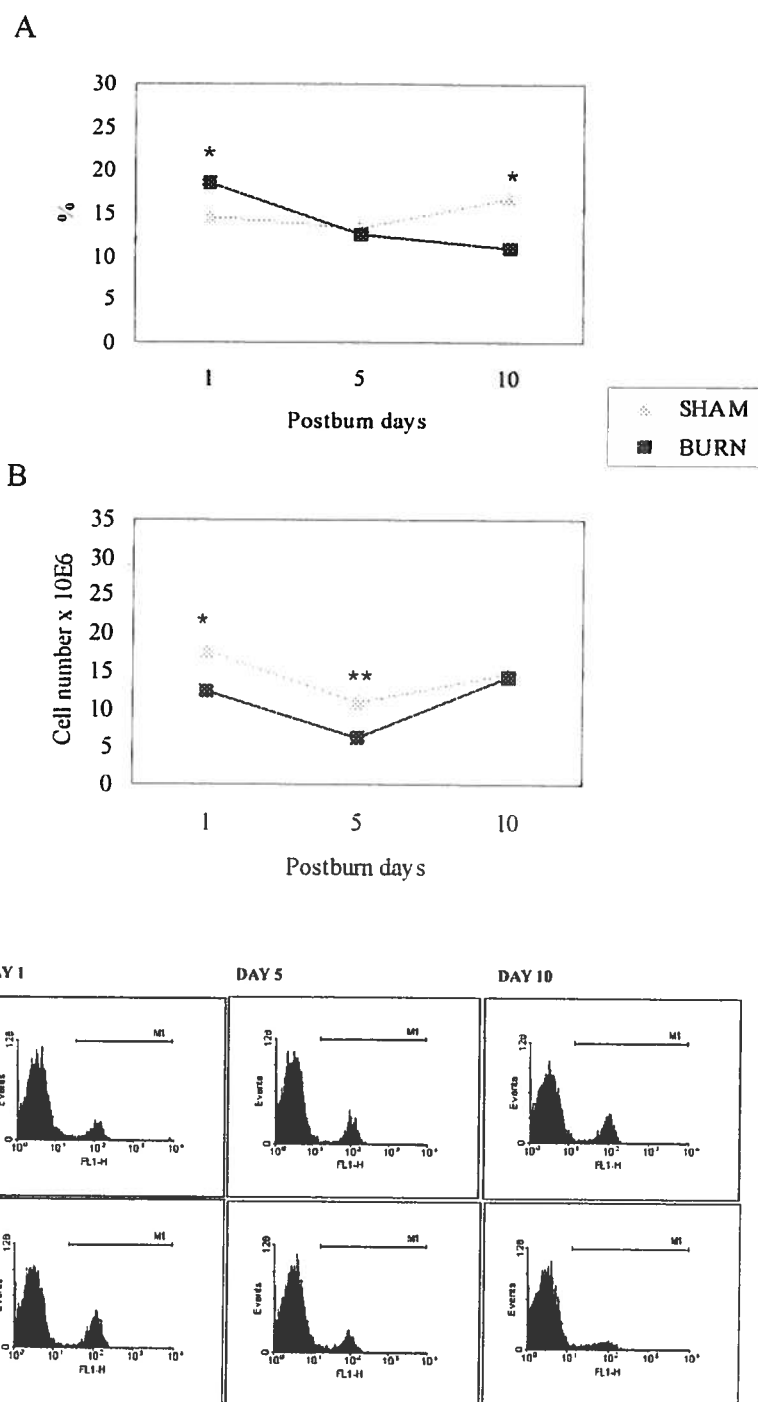
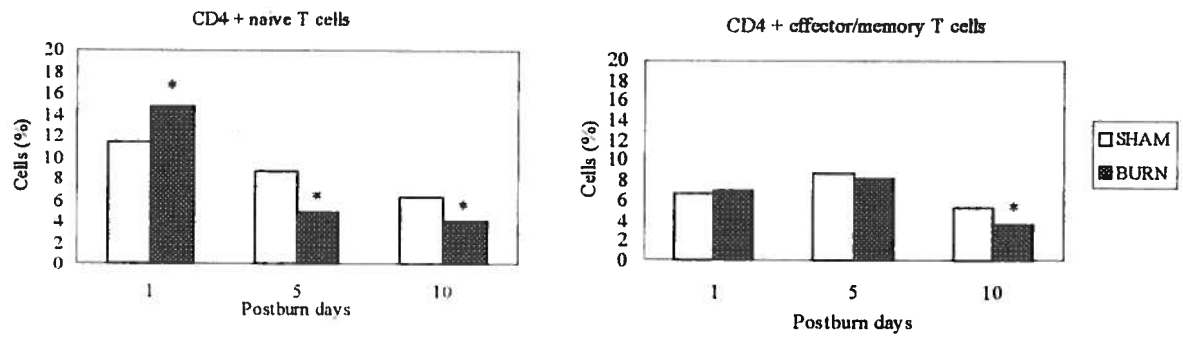
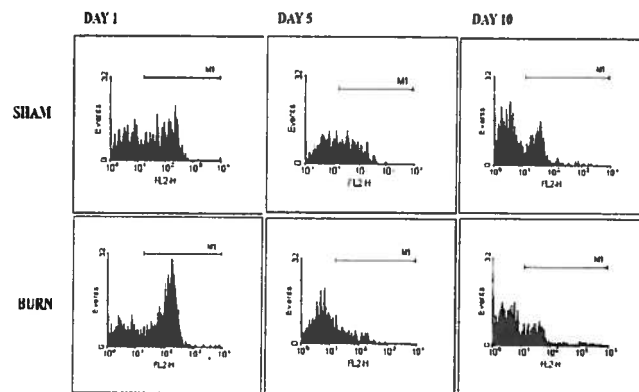


Figure 3

A



B CD4 + naive T cells



C CD4 + effector/memory T cells

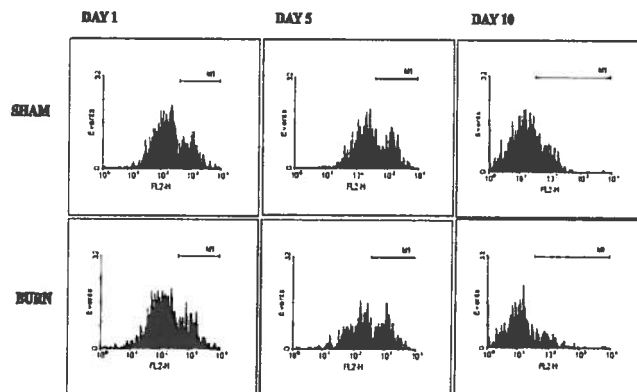


Figure 4

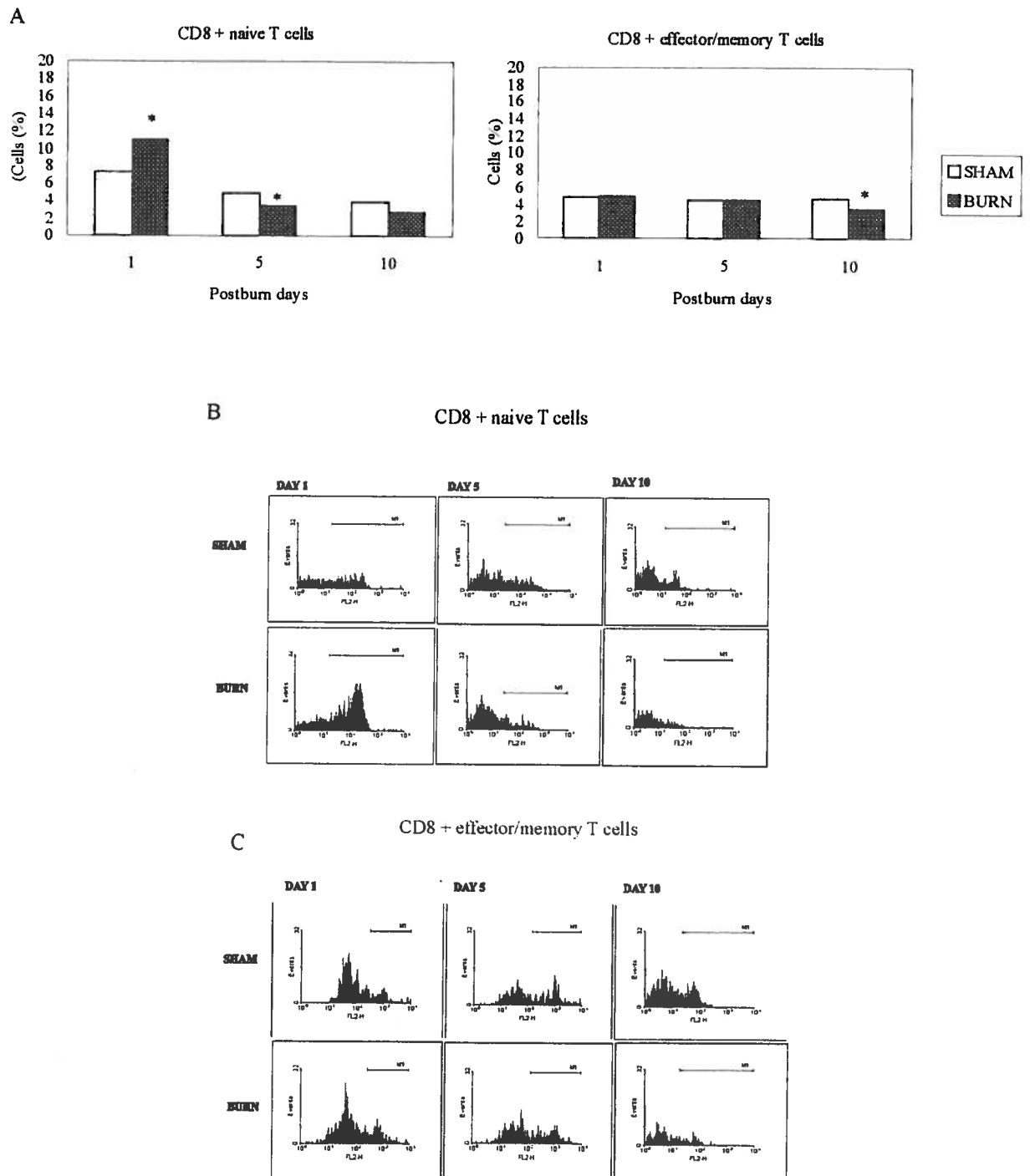
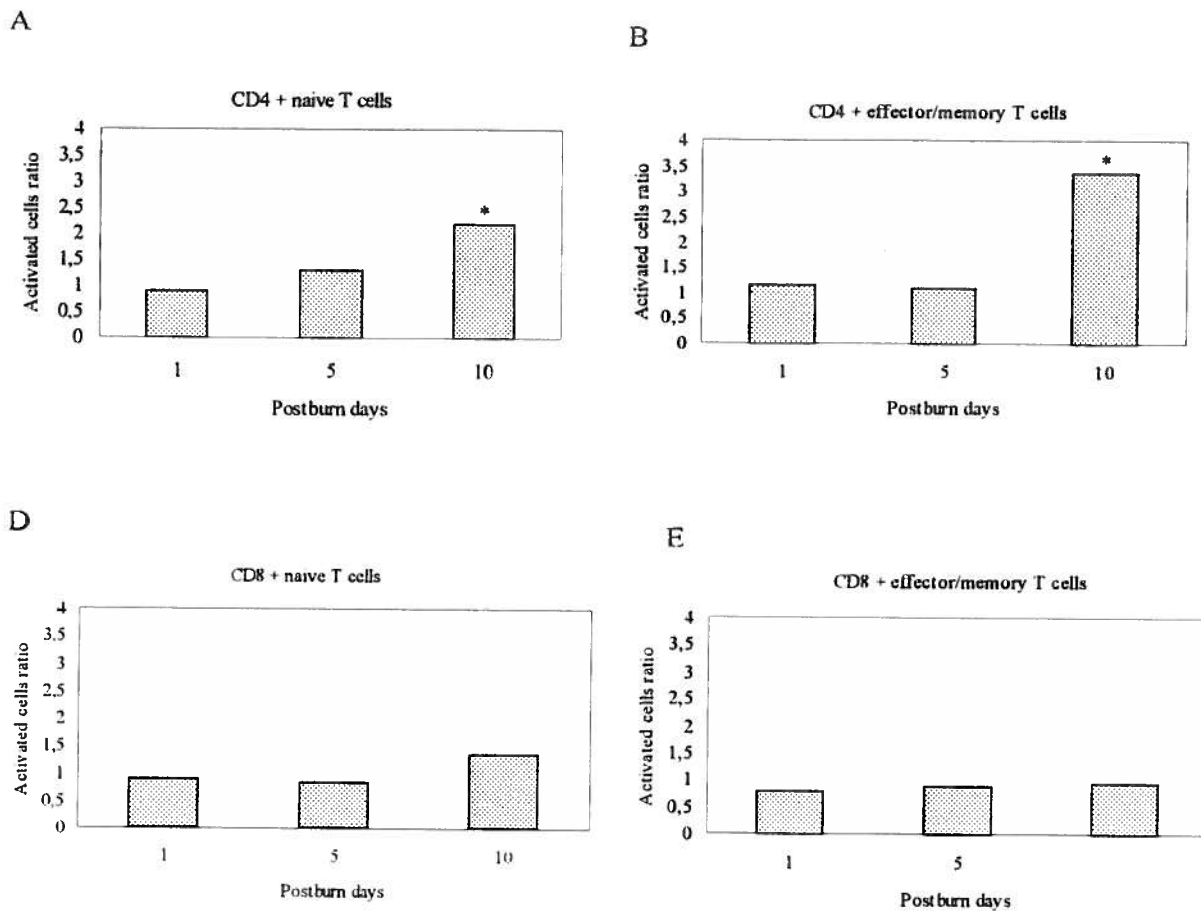
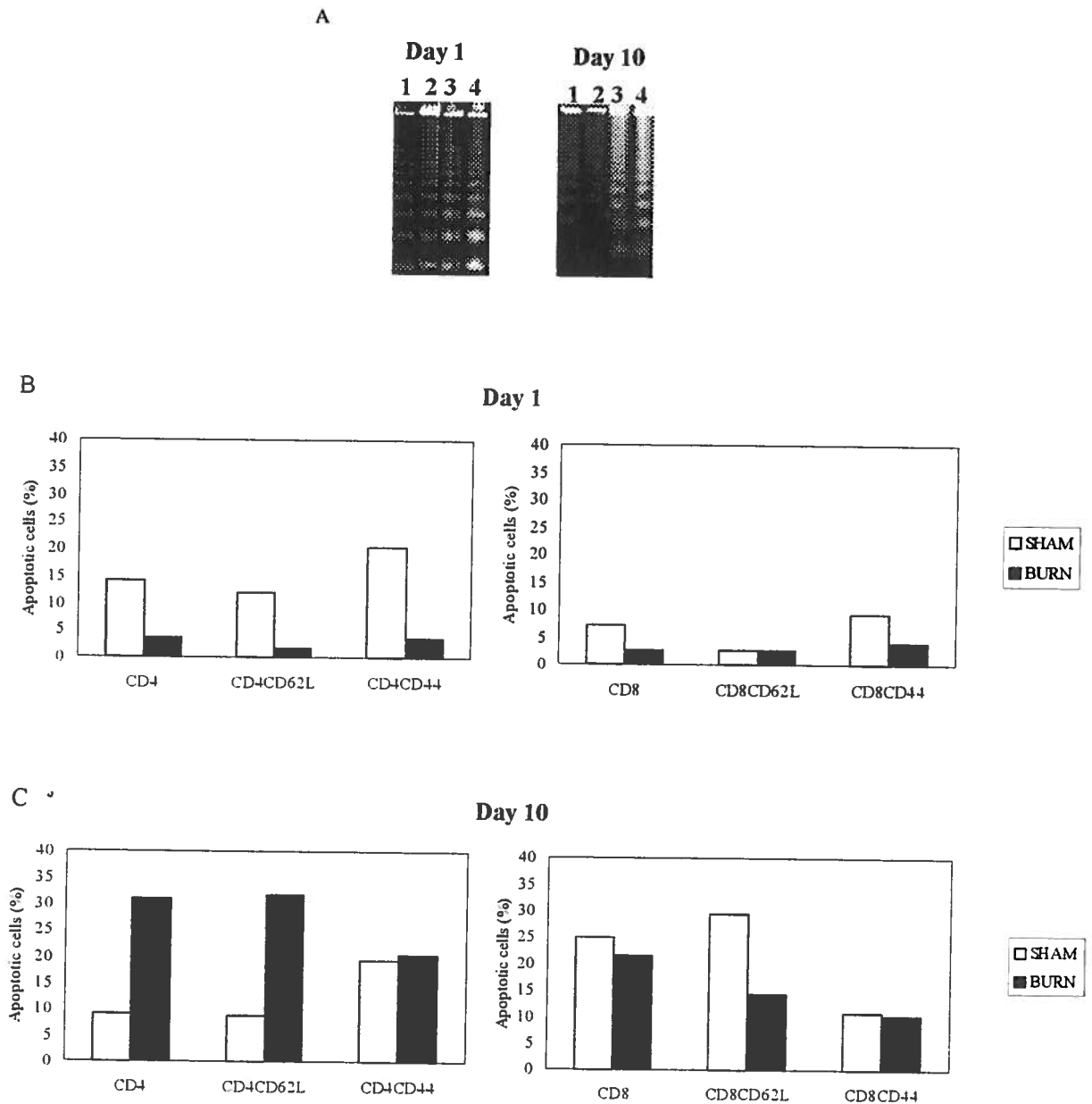
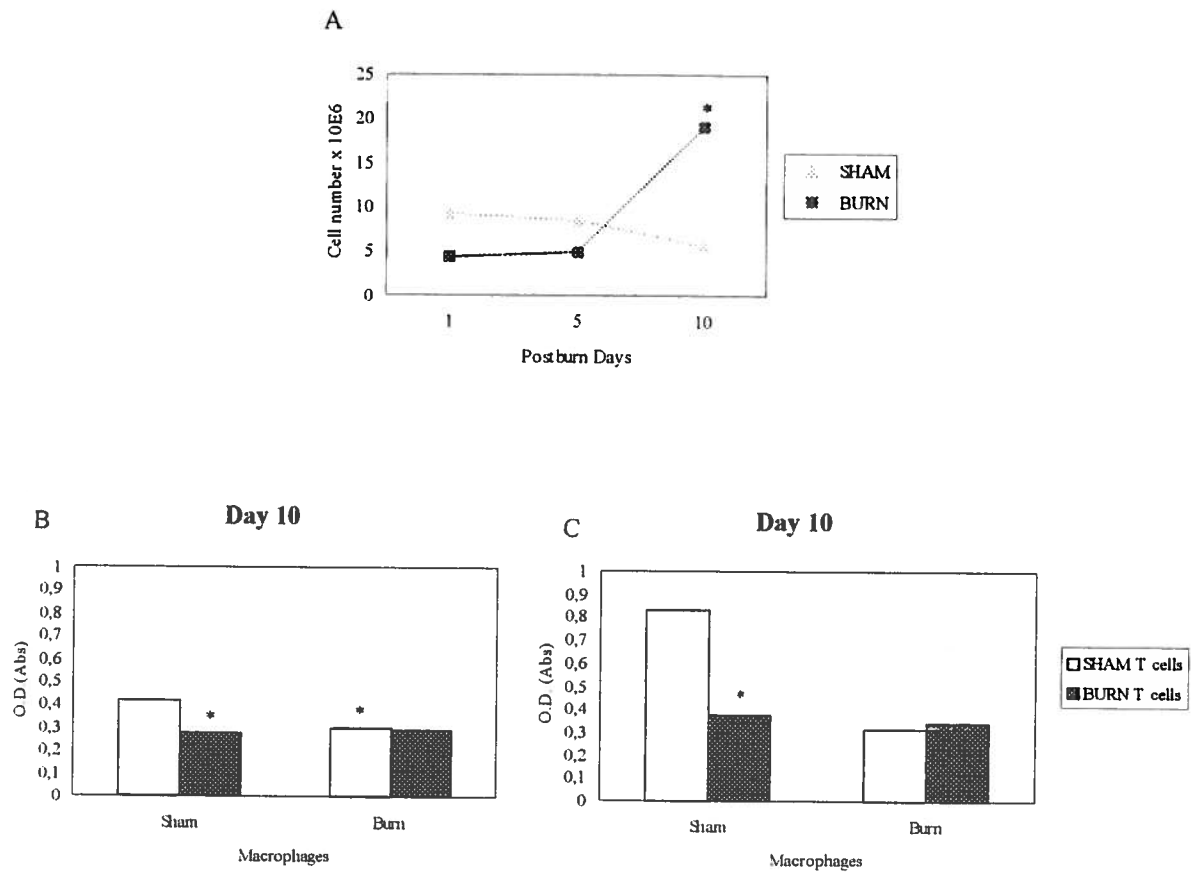


Figure 5

**Figure 6**

**Figure 7**

**Figure 8**

CONCLUSION

L'objectif de cette étude était de déterminer l'effet d'une brûlure sévère sur l'homéostasie des cellules T. Des études antérieures ont clairement démontré l'apparition d'un état d'immunosuppression vers le 7^e ou le 10^e jour suivant une brûlure sévère (Jobin, Garrel et Bernier, 2000a; Jobin, Garrel et Bernier, 2000; Horgan *et al.*, 1994; Banwell *et al.*, 1998). Tout d'abord, il a clairement été démontré qu'une brûlure sévère causait une forte baisse de la cellularité au niveau de la rate, dans les 5 premiers jours suivant le traumatisme. Cette importante élimination de cellules a été suivie d'une augmentation significative du nombre de cellules dans la rate en comparaison avec le groupe témoin, au 10^e jour suivant ce traumatisme. Il a été démontré par la suite qu'une augmentation du pourcentage de macrophages dans la rate était à l'origine de cette hausse de la cellularité dans la rate. Une diminution du nombre de cellules au niveau de la rate pourrait s'expliquer par une forte initiation de la migration des cellules lymphocytaires vers les sites d'inflammation. Des analyses exécutées dans le cadre de cette étude, portant sur l'expression des cellules T des ganglions drainant la plaie (ganglions axillaires et inguinaux), ont démontré une faible augmentation du nombre de cellules T matures 1 jour suivant le traumatisme. Ainsi, après l'induction d'une réponse inflammatoire, les cellules T matures de la rate migreraient vers les ganglions, dans le but d'amorcer une expansion clonale. Puisque la migration des cellules ne peut expliquer intégralement la diminution de cellularité observée dans la rate, une induction de mort cellulaire pourrait également être à l'origine de cette perte. Dans une étude antérieure, il a été observé que l'activité de la caspase-3 augmentait quelques heures suivant le traumatisme, d'où l'induction d'apoptose chez les cellules de la rate (Fukuzuka *et al.*, 1999; Ayala *et al.*, 1996). De plus, des analyses portant sur la structure de la rate ont également montré 24 heures suivant une brûlure, une atrophie de la pulpe blanche, une partie intégrante de la rate composée principalement de lymphocytes (Maekawa *et al.*, 2002). Cette atrophie a été également associée à une diminution du nombre de lymphocytes T et B (Maekawa *et al.*, 2002). Les concentrations élevées de glucocorticoïdes endogènes détectées après une brûlure, seraient en partie responsables de l'activation de la cascade apoptotique chez les lymphocytes T (Fukuzuka *et al.*, 2000). Ainsi, il a été démontré qu'en présence d'un inhibiteur des glucocorticoïdes, il y avait une baisse d'apoptose et de l'activité de la caspase-3 au niveau des thymocytes (Fukuzuka *et al.*, 2000). Toutefois, l'augmentation des concentrations de glucocorticoïdes ne peut expliquer en totalité la hausse des cellules apoptotiques dans la rate. Une augmentation de l'expression de Fas-L, des médiateurs inflammatoires et/ou d'endotoxines pourraient également être la cause de l'activation de la cascade apoptotique suivant le traumatisme d'une brûlure. En effet, il a été observé chez les cellules

lymphocytaires une augmentation de l'expression de FasL, ligand essentiel à l'initiation de l'apoptose suite à sa liaison avec son récepteur Fas (CD95) (Malcom et *al.*, 2000).

Associé à la baisse de la cellularité, il a également été démontré au cours de ce projet que les cellules de la rate proliféraient activement lorsque celles-ci étaient comparées au groupe témoin. Aucune étude par le passé n'avait été à même d'observer *in vivo* la présence de cellules en division dans la rate suite à une brûlure sévère. Ainsi, les analyses faites suite à l'incorporation de BrdU ont démontré qu'à partir du jour 2 et ce jusqu'au jour 10 suivant le traumatisme, les splénocytes possédaient une capacité de prolifération supérieure au groupe-buprénorphine témoin. À noter, que le niveau de prolifération des cellules de la rate du groupe témoin-buprénorphine augmentait également à partir du 5^e jour. Par contre, en comparant le niveau de prolifération du groupe témoin-saline avec le groupe témoin-buprénorphine, il a clairement été démontré que l'augmentation de la prolifération était liée directement à l'administration de buprénorphine. La buprénorphine est un opiacé possédant à la fois une activité agoniste et antagoniste (Gomez-Flores et Weber, 2000). Des études répertoriées dans la littérature ont observé que certains opiacés, tel que la morphine, avaient la capacité de moduler négativement la régulation du système immunitaire (Carr, Rogers et Weber, 1996). Cependant, les résultats obtenus au cours de cette étude ont clairement indiqué que l'exposition à des doses continues de buprénorphine avait aucun effet suppressif sur les fonctions effectrices des cellules de la rate. Ainsi, l'interprétation de ces derniers résultats, nous a permis de démontrer que les cellules matures demeurant dans la rate proliféraient plus suivant une brûlure sévère, malgré une importante diminution du nombre de cellules. Des analyses portant sur la prolifération *in vitro* des cellules de la rate, ont également montré une augmentation de la capacité proliférative de ces dernières 24 heures suivant le traumatisme de la brûlure. Ainsi, une brûlure sévère activerait la prolifération des cellules de la rate, afin de compenser la perte significative de cellules.

Le second objectif de ce projet a été d'identifier l'effet du traumatisme d'une brûlure sur la régulation de l'expression des cellules T CD4⁺ versus CD8⁺ dans la rate, en fonction du temps. Des études faites précédemment dans notre laboratoire, ont permis d'observer une diminution des populations des cellules B et des cellules T suivant la brûlure (Jobin, Garrel et Bernier, 2000). Cependant, nos analyses portant sur l'expression des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ dans la rate, ont démontré que le pourcentage de ces populations lymphocytaires était augmenté 1 jour suivant le traumatisme. Par la suite, il a été observé au 10^e jour post-brûlure, une diminution significative du pourcentage des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ de la rate. Considérant le nombre absolu des cellules

lymphocytaires dans la rate, il a été montré que dans les 5 premiers jours suivant une brûlure, le nombre total des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ était fortement diminué. L'équipe d'Organ avait également noté dans les 6 jours suivant la brûlure, une baisse du nombre total des lymphocytes après quoi le nombre augmentait considérablement au niveau de la rate et des ganglions drainant la plaie (Organ et *al.*, 1988). Cette baisse des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ peut être la résultante d'une augmentation de l'apoptose de ces dernières ou tout simplement d'une migration des cellules de la rate vers les organes lymphoïdes drainant la plaie.

L'ensemble des lymphocytes T périphériques représente un bassin hétérogène, où interagissent de multiples sous-populations lymphocytaires, soit les cellules T naïves, effectrices et/ou mémoires. Le bon maintien d'une réponse immunitaire est dépendant de la balance qui co-existe entre l'expression de ces sous-populations lymphocytaires; phénomène intitulé l'homéostasie. Ainsi, un des objectifs de ce projet a été de déterminer l'effet d'une brûlure sévère au niveau de la régulation des cellules T naïves versus effectrices/mémoires, en fonction du temps. Jusqu'à présent une seule étude avait tenté d'élucider l'effet d'une brûlure sévère sur la répartition des cellules T naïves (CD45RO⁺) versus cellules T mémoires (CD45RO⁻) dans la rate et les ganglions drainant la plaie, chez le rat (Lawrence, Riesthal et Clavano, 1996). Toutefois, cette dernière étude n'a pu qu'observer l'effet modulateur de la brûlure qu'au 6^e jour post-trauma. Étant donné que plusieurs études ont clairement établi que l'état d'immunosuppression observé après une brûlure sévère, apparaissait entre le 7^e et le 14^e jour, il serait plus approprié d'étudier les changements de ces populations lymphocytaires avant et après l'apparition de cet état (Banwell et *al.*, 1998; Jobin, Garrel et Bernier, 2000a; Jobin, Garrel et Bernier, 2000). Ainsi, nous pourrions déterminer si l'effet d'une brûlure sévère perturberait le ratio des cellules T naïves versus effectrices/mémoires, changeant ainsi l'homéostasie des lymphocytes. Il a donc été observé que l'expression des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ naïves (CD62L^{HIGH}CD44^{LOW}) était significativement augmentée 1 jour suivant la brûlure. Cependant, l'expression des cellules T naïves était fortement réduite à partir du 5^e jour suivant une brûlure, pour ensuite demeurer à des niveaux d'expression inférieurs à ceux observés chez le groupe témoin. L'expression des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ effectrices/mémoires (CD62L^{LOW}CD44^{HIGH}) était également diminuée 10 jours suivant le traumatisme d'une brûlure sévère. Ces résultats ont donc permis de démontrer que la brûlure sévère affectait l'expression des diverses populations lymphocytaires dans la rate; cellules essentielles au bon maintien et à l'homéostasie de la réponse immunitaire. Ces modifications observées au niveau du ratio des populations lymphocytaires de la rate étaient significativement plus importantes au 10^e jour suivant une brûlure sévère.

Qu'en était-il de l'activation de ces populations lymphocytaires suivant une brûlure sévère? Plusieurs études ont tenté d'élucider la régulation de l'activation des lymphocytes T suivant ce traumatisme, par l'expression de l'IL-2R ou par leur capacité à produire de l'IL-2. Cependant peu d'études ont été en mesure de démontrer un niveau d'activation subséquent à une brûlure sévère (Teodorczyk-Injeyan *et al.*, 1987; Horgan *et al.*, 1994). Alors qu'un bon nombre d'études ont noté une baisse de l'activation des lymphocytes T, seule l'équipe de Maldonado-Lopez a observé dans les 48 heures suivant une brûlure, une augmentation de l'expression des marqueurs d'activation chez les lymphocytes T périphériques (Maldonado-Lopez *et al.*, 1991). Toutefois, aucune étude n'a été à même d'identifier la nature des lymphocytes T activés suivant le traumatisme de la brûlure, en fonction du temps. Il a donc été démontré au cours de ce projet, qu'une brûlure sévère induisait l'activation des cellules T CD4⁺ naïves et effectrices au 10^e jour post-trauma. À noter qu'à cette même période, le nombre de cellules T CD4⁺ effectrices activées était supérieur à celui mesuré chez les cellules T CD4⁺ naïves. Ces derniers résultats peuvent s'expliquer par le fait que les cellules effectrices répondent plus efficacement et plus rapidement à une stimulation antigénique, même en absence de molécules de co-stimulation, leur conférant ainsi le pouvoir d'être activées par un plus grand nombre de CPA. Puisqu'il a été observé une augmentation des macrophages dans la rate au jour 10, ces derniers favoriseraient l'expansion clonale de cellules T effectrices, suivant une brûlure sévère. Ainsi, les macrophages qui expriment des molécules du CMH de classe II vont plutôt présenter l'antigène aux cellules T CD4⁺ effectrices. De plus, les macrophages possèdent une capacité moindre que les cellules dendritiques à stimuler les cellules T naïves, par leur faible taux de molécules de co-stimulation, d'où une augmentation des cellules T effectrices activées (Aderem et Underhill, 1999). De plus, le relâchement des protéines du soi dégradées et la présence de peptides altérés, peuvent également être responsables de l'activation immédiate des cellules T CD4⁺ effectrices dans la rate.

Par la suite, les cellules T effectrices activées participeront à l'activation des cellules T CD4⁺ naïves par leur production massive de cytokines nécessaires à la prolifération et à l'activation lymphocytaire. Cette hausse des cellules T CD4⁺ effectrices activées dans la rate, peut être également la résultante d'un changement d'expression des molécules de surface des cellules T CD4⁺ naïves. Ainsi, une fois activées, les cellules T CD4⁺ naïves changeront leur phénotype CD62L^{HIGH}CD44^{LOW} vers un phénotype CD62L^{LOW}CD44^{HIGH} (Dutton, Bradley et Swain, 1998). Ce changement phénotypique expliquerait en la baisse d'expression des cellules T naïves observée au 10^e jour suivant le traumatisme. De plus, les cellules T effectrices activées, qui expriment des taux

élevés d'intégrines, vont préférentiellement migrer vers les sites d'inflammation, exprimant leurs ligands respectifs (ex. : ICAM-1). Cette migration des cellules T matures induirait une diminution du nombre de cellules effectrices/mémoires dans la rate, phénomène observé 10 jours post-brûlure (Dutton, Bradley et Swain, 1998). Toutefois, aucune variation de l'activation des cellules T CD8⁺ n'a été observée, en comparaison avec le groupe témoin et en fonction du temps, après une brûlure sévère. Par l'ensemble de ces analyses, il a été clairement démontré qu'une brûlure sévère provoquait diverses modifications sur la régulation des cellules T, observées par un changement au niveau de l'homéostasie et de l'activation des cellules.

L'équilibre qui co-existe entre la prolifération et l'induction de mort cellulaire chez les cellules T, influencera également l'homéostasie de ces dernières. Au cours de ce projet, il a été voulu d'observer la corrélation entre l'activation des cellules T et leur niveau d'apoptose, afin d'élucider leur rôle respectif dans l'état d'immunosuppression après une brûlure. Plusieurs évidences portent à croire qu'une brûlure sévère induirait la mort cellulaire programmée (apoptose) des cellules T, d'où une perte de leurs fonctions effectrices (Fukuzuka et *al.*, 1999; Ayala et *al.*, 1996). Toutefois, aucune étude n'a été en mesure d'identifier la nature des cellules apoptotiques afin d'établir une relation causale entre les niveaux d'apoptose et l'incapacité de générer une réponse immunitaire adéquate suivant une brûlure. Alors qu'il a été observé 1 jour suivant la brûlure, une baisse significative de la cellularité, une augmentation du pourcentage des cellules prolifératives, ainsi qu'une augmentation de l'expression des sous-populations lymphocytaires, il a été noté pour cette même période, que les lymphocytes T de la rate présentaient des niveaux d'apoptose équivalents ou inférieurs au groupe témoin. Un jour suivant la brûlure, les cellules T CD4⁺ naïves et effectrices étaient moins susceptibles au processus d'apoptose, observé par une diminution des cellules en phase sub-G0 après l'incorporation de 7AAD. Les mêmes faits ont été observés pour les cellules T CD8⁺ naïves et effectrices au niveau de la rate. Alors qu'on notait 1 jour suivant le traumatisme, une réduction significative du nombre des cellules dans la rate, il semblerait que tout soit mis en branle pour compenser cette perte et pour générer une réponse immunitaire minimale. Cette diminution de l'apoptose pourrait s'expliquer par une diminution de l'expression de Fas-L ou une surexpression du gène anti-apoptotique Bcl-2 (Vaux et *al.*, 1988; Rathmell et Thompson, 1999).

Au 10^e jour suivant une brûlure, il a été démontré que l'induction de l'apoptose au niveau des cellules T de la rate était à la hausse. Cette induction d'apoptose a d'abord été observée par une augmentation de la fragmentation internucléosomale en comparaison avec le groupe témoin. Par la suite, l'analyse du cycle cellulaire des cellules de la rate a permis de démontrer que les cellules T

CD4⁺ étaient fortement induites en apoptose. Les cellules T CD4⁺ naïves exprimaient au 10^e jour suivant le traumatisme, des niveaux d'apoptose 3 fois supérieurs à ceux observés chez le groupe témoin. Malgré une activation des cellules T CD4⁺ naïves, ces dernières sont fortement induites en apoptose, d'où l'absence de génération d'une réponse immunitaire adéquate. Cependant, à cette même période post-trauma, les niveaux d'apoptose des cellules T CD4⁺ effectrices étaient équivalents entre les deux groupes étudiés. Des études antérieures ont démontré que les cellules effectrices, en comparaison avec les cellules T naïves, étaient plus résistantes à l'induction de mort cellulaire induite par activation (AICD) initiée par l'engagement du récepteur Fas (Dutton, Bradley et Swain, 1998). Cette résistance est probablement due à désensibilisation des cellules effectrices à entrer en apoptose via l'activation du récepteur Fas. Ainsi, les cellules T CD4⁺ effectrices activées dans la rate permettraient de maintenir une réponse immunitaire basale, afin de générer une certaine protection à l'organisme. Au cours de cette étude, il a également été observé que les cellules T CD8⁺ naïves et effectrices présentaient des niveaux d'apoptose inférieur ou équivalents en comparaison avec le groupe témoin, 10 jours suivant la brûlure. Ainsi, les cellules T CD8⁺ ne sont pas affectées négativement via le processus de l'apoptose, permettant ainsi une certaine activité cytotoxique suite au traumatisme.

L'incapacité des cellules T à être stimulées pour une future expansion clonale, pourrait également expliquer l'apparition d'un état d'immunosuppression au 10^e jour suivant une brûlure sévère. Comme il a été mentionné précédemment, l'augmentation du nombre de macrophages au 10^e jour suivant le traumatisme, était à l'origine de cette hausse de la cellularité. Une étude récente a également observé une augmentation des cellules hématopoïétiques à se différencier en monocytes/macrophages, haussant ainsi l'accessibilité de ces cellules à induire une réponse immunitaire adaptative (Wallner et *al.*, 1984). Étant donné qu'une fois les macrophages stimulés, ces derniers vont entrer dans la rate dans le but de présenter l'antigène aux lymphocytes, nous avons voulu mesurer la capacité des macrophages à stimuler les cellules T suite à une brûlure. En analysant la capacité de prolifération des lymphocytes, il a été observé que les cellules T du groupe témoin proliféraient adéquatement en présence des macrophages du groupe témoin. De plus, en présence d'IL-2 recombinant (IL-2r), la capacité de prolifération des cellules T était augmentée, un phénomène semblable à celui observé *in vivo*. Cependant, il a été noté que les lymphocytes T provenant du groupe-brûlé proliféraient moins en présence des macrophages du groupe témoin, même après l'ajout d'IL-2r. Ces derniers résultats ont permis de conclure qu'au 10^e jour suivant la brûlure, plusieurs cellules T de la rate étaient dans un état d'anergie dépendamment de la présence des macrophages. Cette induction d'anergie chez les lymphocytes T peut être d'origine

multifactorielle; telle qu'une baisse de l'expression du récepteur IL-2R ou une augmentation des cytokines Th2 (De et *al.*, 2000; Pelligrini et *al.*, 2000). Au cours de cette étude, il a également été démontré que les macrophages du groupe brûlé avaient une capacité moindre à activer les lymphocytes T du groupe-témoin, observé par une diminution de la prolifération lymphocytaire. Ainsi, la brûlure sévère altère non seulement les cellules T mais également les fonctions effectrices des macrophages. La production aberrante de médiateurs immunosuppresseurs, tels que les PGE₂, pourrait causer ces perturbations au niveau des fonctions des macrophages (Grbic et *al.*, 1991). Ces dernières analyses ont donc permis de montrer qu'au 10^e jour suivant une brûlure sévère, une partie des cellules T étaient dans un état d'anergie.

En conclusion, les travaux effectués dans le cadre de ce projet de recherche ont clairement démontré qu'une brûlure sévère altérait l'homéostasie des cellules T. C'est la première étude qui a prouvé que l'état d'immunosuppression, observé au 10^e jour, était en partie la résultante d'une forte induction de mort cellulaire induite par activation (AICD) chez les cellules CD4⁺ naïves. Cette activation de l'apoptose a donc eu pour conséquence de changer l'homéostasie des cellules T, suite au traumatisme. Malgré un niveau d'activation élevé, les cellules T CD4⁺ naïves sont incapables d'initier une réponse immunitaire appropriée, due à leur forte susceptibilité d'entrer en apoptose. Même si les autres sous-populations lymphocytaires sont moins susceptibles au processus de mort cellulaire, ces travaux ont également démontré qu'une partie de l'ensemble des lymphocytes T était dans un état d'anergie. Outre les cellules T, les fonctions effectrices des macrophages sont aussi altérées, diminuant ainsi la capacité du système immunitaire à générer une réponse immunitaire adéquate, d'où l'apparition de septicémies chez les patients gravement brûlés. Plusieurs travaux devront être effectués afin de caractériser et de définir les mécanismes responsables des perturbations observées au niveau des lymphocytes T, suivant une brûlure. Cette étude à long terme sera profitable pour la recherche clinique, puisqu'elle permettra d'orienter le traitement des grands brûlés afin d'augmenter leurs chances de survie face aux infections opportunistes.

RÉFÉRENCES

- ABBAS, A.K., Litchman, A.H., Pober J.S., 1997, Cellular and Molecular immunology, 3e edition, Philadelphie, Saunders Text and Review Series, 492p
- ACUTO, O. and D. Cantrell. 2000. «T Cell Activation and the Cytoskeleton». Annual Reviews of Immunology, vol. 18, p. 165-84.
- ADEREM, A. and D. M. Underhill. 1999. «Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages». Annual Reviews of Immunology, vol. 17, p. 593-623.
- AHMADZADEH, M., S. F. Hussain, and D. L. Farber. 1999. «Effector CD4 T Cells Are Biochemically Distinct From the Memory Subset: Evidence for Long-Term Persistence of Effectors *in vivo*». Journal of Immunology, vol. 163, no. 6, p. 3053-63.
- ALBEROLA-ILA, J., S. Takaki, J. D. Kerner, and R. M. Perlmutter. 1997. «Differential Signaling by Lymphocyte Antigen Receptors». Annual Reviews of Immunology, vol. 15, p. 125-54.
- ALBERT, M. L., B. Sauter, and N. Bhardwaj. 1998. «Dendritic Cells Acquire Antigen From Apoptotic Cells and Induce Class I- Restricted CTLs». Nature, vol. 392, no. 6671, p. 86-9.
- ALEXANDER, J. W. and J. A. Moncrief. 1966. «Alterations of the Immune Response Following Severe Thermal Injury». Archives of Surgery, vol. 93, no. 1, p. 75-83.
- ANTONACCI, A. C., R. A. Good, and S. Gupta. 1982. «T-Cell Subpopulations Following Thermal Injury». Surgery Gynecology & Obstetrics, vol. 155, no. 1, p. 1-8.
- ANTONACCI, A. C., L. E. Reaves, S. E. Calvano, R. Amand, H. F. De Riesthal, and G. T. Shires. 1984. «Flow Cytometric Analysis of Lymphocyte Subpopulations After Thermal Injury in Human Beings». Surgery Gynecology & Obstetrics, vol. 159, no. 1, p. 1-8.
- ARNAOUT, M. A. 1990. «Structure and Function of the Leukocyte Adhesion Molecules CD11/CD18». Blood, vol. 75, no. 5, p. 1037-50.
- AYALA, A., C. S. Chung, G. Y. Song, and I. H. Chaudry. 2001. «IL-10 Mediation of Activation-Induced TH1 Cell Apoptosis and Lymphoid Dysfunction in Polymicrobial Sepsis». Cytokine, vol. 14, no. 1, p. 37-48.
- AYALA, A., C. S. Chung, Y. X. Xu, T. A. Evans, K. M. Redmond, and I. H. Chaudry. 1999. «Increased Inducible Apoptosis in CD4+ T Lymphocytes During Polymicrobial Sepsis Is Mediated by Fas Ligand and Not Endotoxin». Immunology, vol. 97, no. 1, p. 45-55.
- AYALA, A., M. A. Urbanich, C. D. Herdon, and I. H. Chaudry. 1996. «Is Sepsis-Induced Apoptosis Associated With Macrophage Dysfunction?». Journal of Trauma, vol. 40, no. 4, p. 568-73; discussion 573-4.
- BAKER, C. C., A. H. Yamada, E. Faist, and T. S. Kupper. 1987. «Interleukin-1 and T Cell Function Following Injury». Journal of Burn Care & Rehabilitation, vol. 8, no. 6, p. 503-8.
- BAMBERGER, T., I. Masson, J. Mathieu, L. Chauvelot-Moachon, J. P. Giroud, and I. Florentin. 1992. «Nitric Oxide Mediates the Depression of Lymphoproliferative Responses Following Burn

Injury in Rats». Biomedicine & Pharmacotherapy, vol. 46, no. 10, p. 495-500.

BANWELL, P. E., A. M. Watts, J. V. Murphy, and A. H. Roberts. 1998. «Immunosuppression Following Thermal Injury». British Journal of Plastic Surgery, vol. 51, no. 5, p. 411.

BARLOW, Y. 1994. «T Lymphocytes and Immunosuppression in the Burned Patient: a Review». Burns, vol. 20, no. 6, p. 487-90.

BARON, P., L. D. Traber, D. L. Traber, T. Nguyen, M. Hollyoak, J. P. Heggers, and D. N. Herndon. 1994. «Gut Failure and Translocation Following Burn and Sepsis». Journal of Surgery Research, vol. 57, no. 1, p. 197-204.

BARRIOS-RODILES, M. and K. Chadee. 1998. «Novel Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin E2 Production by IFN-Gamma in Human Macrophages». Journal of Immunology, vol. 161, no. 5, p. 2441-8.

BARRIOS-RODILES, M., G. Tiraloché, and K. Chadee. 1999. «Lipopolysaccharide Modulates Cyclooxygenase-2 Transcriptionally and Posttranscriptionally in Human Macrophages Independently From Endogenous IL-1 Beta and TNF-Alpha». Journal of Immunology, vol. 163, no. 2, p. 963-9.

BECKER, J. C., T. Brabletz, T. Kirchner, C. T. Conrad, E. B. Brocker, and R. A. Reisfeld. 1995. «Negative Transcriptional Regulation in Anergic T Cells». Proceedings of National Academy Sciences U S A, vol. 92, no. 6, p. 2375-8.

BERNABEI, P., L. Rigamonti, S. Ariotti, M. Stella, C. Castagnoli, and F. Novelli. 1999. «Functional Analysis of T Lymphocytes Infiltrating the Dermis and Epidermis of Post-Burn Hypertrophic Scar Tissues». Burns, vol. 25, no. 1, p. 43-8.

BJERKNES, R., H. Vindenes, and O. D. Laerum. 1990. «Altered Neutrophil Functions in Patients With Large Burns». Blood Cells, vol. 16, no. 1, p. 127-41; discussion 142-3.

BOISMENU, R., L. Feng, Y. Y. Xia, J. C. Chang, and W. L. Havran. 1996. «Chemokine Expression by Intraepithelial Gamma Delta T Cells. Implications for the Recruitment of Inflammatory Cells to Damaged Epithelia». Journal of Immunology, vol. 157, no. 3, p. 985-92.

BOLOGNA, M., V. Gatti, A. Brancati, and R. Strom. 1974. «[Changes in the Immune Response in the Mouse Following Thermal Shock. II. Rejection of Allogenic Tumors and Response of Circulating Lymphocytes to Phytohemagglutinins]». Boll Soc Ital Biol Sper, vol. 50, no. 1-2, p. 39-43.

BOURSALIAN, T. E. and K. Bottomly. 1999. «Stability of Naive and Memory Phenotypes on Resting CD4 T Cells *in vivo*». Journal of Immunology, vol. 162, no. 1, p. 9-16.

BOURSALIAN, T. E. and K. Bottomly. 1999. «Survival of Naive CD4 T Cells: Roles of Restricting Versus Selecting MHC Class II and Cytokine Milieu». Journal of Immunology, vol. 162, no. 7, p. 3795-801.

BOUSSIOTIS, V. A., G. J. Freeman, A. Berezovskaya, D. L. Barber, and L. M. Nadler. 1997. «Maintenance of Human T Cell Anergy: Blocking of IL-2 Gene Transcription by Activated Rap1». Science, vol. 278, no. 5335, p. 124-8.

BOWEN, F., J. Haluskey, and H. Quill. 1995. «Altered CD40 Ligand Induction in Tolerant T Lymphocytes». European Journal of Immunology, vol. 25, no. 10, p. 2830-4.

BURLESON, D. G., A. D. Mason Jr, and B. A. Pruitt Jr. 1988. «Lymphoid Subpopulation Changes After Thermal Injury and Thermal Injury With Infection in an Experimental Model». Annals of Surgerv, vol. 207, no. 2, p. 208-12.

CAIRNS, B. A., R. Maile, I. Buchanan, D. Pilati, S. DeSerres, E. J. Collins, J. A. Frelinger, and A. A. Meyer. 2001. «CD8(+) T Cells Express a T-Helper 1--Like Phenotype After Burn Injury». Surgerv, vol. 130, no. 2, p. 210-6.

CALVANO, S. E., H. F. deRiesthal, M. A. Marano, and A. C. Antonacci. 1988. «The Decrease in Peripheral Blood CD4+ T Cells Following Thermal Injury in Humans Can Be Accounted for by a Concomitant Decrease in Suppressor- Inducer CD4+ T Cells As Assessed Using Anti-CD45R». Clinical Immunology & Immunopathology, vol. 47, no. 2, p. 164-73.

CAMPBELL, J. J. and E. C. Butcher. 2000. «Chemokines in Tissue-Specific and Microenvironment-Specific Lymphocyte Homing». Current Opinion in Immunology, vol. 12, no. 3, p. 336-41.

CARR, D. J., T. J. Rogers, and R. J. Weber. 1996. «The Relevance of Opioids and Opioid Receptors on Immunocompetence and Immune Homeostasis». Experimental Biology and Medecine, vol. 213, no. 3, p. 248-57.

CARRENO, B. M. and M. Collins. 2002. «The B7 Family of Ligands and Its Receptors: New Pathways for Costimulation and Inhibition of Immune Responses». Annual Reviews of Immunology, vol. 20, p. 29-53.

CASTELLANOS, M. C., C. Munoz, M. C. Montoya, E. Lara-Pezzi, M. Lopez-Cabrera, and M. O. de Landazuri. 1997. «Expression of the Leukocyte Early Activation Antigen CD69 Is Regulated by the Transcription Factor AP-1». Journal of Immunology, vol. 159, no. 11, p. 5463-73.

CESARIO, T. C., L. M. Slater, S. A. Armentrout, L. D. Thrupp, and J. G. Tilles. 1978. «Septicemia in Acute Leukemia». Medicine of Pediatric Oncology, vol. 5, no. 1, p. 193-203.

CHAN, A. C., M. Iwashima, C. W. Turck, and A. Weiss. 1992. «ZAP-70: a 70 Kd Protein-Tyrosine Kinase That Associates With the TCR Zeta Chain». Cell, vol. 71, no. 4, p. 649-62.

CHAO, D. T. and S. J. Korsmeyer. 1998. «BCL-2 Family: Regulators of Cell Death». Annual Reviews of Immunology, vol. 16, p. 395-419.

CHARO, I. F., C. Yuen, H. D. Perez, and I. M. Goldstein. 1986. «Chemotactic Peptides Modulate Adherence of Human Polymorphonuclear Leukocytes to Monolayers of Cultured Endothelial Cells». Journal of Immunology, vol. 136, no. 9, p. 3412-9.

CHO, K., L. K. Adamson, and D. G. Greenhalgh. 2001. «Parallel Self-Induction of TNF-Alpha and Apoptosis in the Thymus of Mice After Burn Injury». Journal of Surgery Research, vol. 98, no. 1, p. 9-15.

CHOUDHRY, M. A., S. Uddin, and M. M. Sayeed. 1998. «Prostaglandin E2 Modulation of P59fyn Tyrosine Kinase in T Lymphocytes During Sepsis». Journal of Immunology, vol. 160, no. 2, p. 929-35.

COHEN, J. J., R. C. Duke, V. A. Fadok, and K. S. Sellins. 1992. «Apoptosis and Programmed Cell Death in Immunity». Annual Reviews of Immunology, vol. 10, p. 267-93.

CROFT, M., L. M. Bradley, and S. L. Swain. 1994. «Naive Versus Memory CD4 T Cell Response to Antigen. Memory Cells Are Less Dependent on Accessory Cell Costimulation and Can Respond to Many Antigen-Presenting Cell Types Including Resting B Cells». Journal of Immunology, vol. 152, no. 6, p. 2675-85.

CUEVAS, P., M. Ishiyama, S. Koizumi, P. Woodruff, A. Kaufman, and J. Fine. 1974. «Role of Endotoxemia of Intestinal Origin in Early Death From Large Burns». Surgery Gynecology & Obstetrics, vol. 138, no. 5, p. 725-30.

DE, A. K., K. Kodys, J. C. Puyana, G. Fudem, J. Pellegrini, and C. L. Miller-Graziano. 1997. «Only a Subset of Trauma Patients With Depressed Mitogen Responses Have True T Cell Dysfunctions». Clinical Immunology & Immunopathology, vol. 82, no. 1, p. 73-82.

DE, A. K., K. M. Kodys, J. Pellegrini, B. Yeh, R. K. Furse, P. Bankey, and C. L. Miller-Graziano. 2000. «Induction of Global Anergy Rather Than Inhibitory Th2 Lymphokines Mediates Posttrauma T Cell Immunodepression». Clinical Immunology, vol. 96, no. 1, p. 52-66.

DE BOER, J. P., G. J. Wolbink, L. G. Thijs, J. W. Baars, J. Wagstaff, and C. E. Hack. 1992. «Interplay of Complement and Cytokines in the Pathogenesis of Septic Shock». Immunopharmacology, vol. 24, no. 2, p. 135-48.

DEITCH, E. A. and R. Berg. 1987. «Bacterial Translocation From the Gut: a Mechanism of Infection». Journal of Burn Care & Rehabilitation, vol. 8, no. 6, p. 475-82.

DEITCH, E. A., K. N. Landry, and J. C. McDonald. 1985. «Postburn Impaired Cell-Mediated Immunity May Not Be Due to Lazy Lymphocytes but to Overwork». Annals of Surgery, vol. 201, no. 6, p. 793-802.

DEITCH, E. A., J. Winterton, and R. Berg. 1986. «Thermal Injury Promotes Bacterial Translocation From the Gastrointestinal Tract in Mice With Impaired T-Cell-Mediated Immunity». Archives of Surgery, vol. 121, no. 1, p. 97-101.

DEITCH, E. A., D. Z. Xu, and L. Qi. 1990. «Different Lymphocyte Compartments Respond Differently to Mitogenic Stimulation After Thermal Injury». Annals of Surgery, vol. 211, no. 1, p. 72-7.

DEMLING, R. H. and P. Seigne. 2000. «Metabolic Management of Patients With Severe Burns». World Journal of Surgery, vol. 24, no. 6, p. 673-80.

DESILVA, D. R., K. B. Urdahl, and M. K. Jenkins. 1991. «Clonal Anergy Is Induced *in vitro* by T Cell Receptor Occupancy in the Absence of Proliferation». Journal of Immunology, vol. 147, no. 10, p. 3261-7.

DEVERAUX, Q. L., R. Takahashi, G. S. Salvesen, and J. C. Reed. 1997. «X-Linked IAP Is a Direct Inhibitor of Cell-Death Proteases». Nature, vol. 388, no. 6639, p. 300-4.

DING, L., P. S. Linsley, L. Y. Huang, R. N. Germain, and E. M. Shevach. 1993. «IL-10 Inhibits Macrophage Costimulatory Activity by Selectively Inhibiting the Up-Regulation of B7 Expression». Journal of Immunology, vol. 151, no. 3, p. 1224-34.

- DING, L. and E. M. Shevach. 1992. «IL-10 Inhibits Mitogen-Induced T Cell Proliferation by Selectively Inhibiting Macrophage Costimulatory Function». Journal of Immunology, vol. 148, no. 10, p. 3133-9.
- DOBKE, M. K., E. A. Deitch, T. J. Harnar, and C. R. Baxter. 1989. «Oxidative Activity of Polymorphonuclear Leukocytes After Thermal Injury». Archives of Surgery, vol. 124, no. 7, p. 856-9.
- DOLGUSHIN, I. I. and L. I. a. Ebert. 1980. «Functional Activity of T- and B-Lymphocytes in Thermal Burns». Biull Eksp Biol Med, vol. 89, no. 7, p. 75-7.
- DONG, Y. L., D. N. Herndon, T. Z. Yan, and J. P. Waymack. 1993. «Blockade of Prostaglandin Products Augments Macrophage and Neutrophil Tumor Necrosis Factor Synthesis in Burn Injury». Journal of Surgery Research, vol. 54, no. 5, p. 480-5.
- DURBIN, E. A., M. S. Gregory, K. A. Messingham, C. V. Fontanilla, L. A. Duffner, and E. J. Kovacs. 2000. «The Role of Interleukin 6 in Interferon-Gamma Production in Thermally Injured Mice». Cytokine, vol. 12, no. 11, p. 1669-75.
- DUTTON, R. W., L. M. Bradley, and S. L. Swain. 1998. «T Cell Memory». Annual Reviews of Immunology, vol. 16, p. 201-23.
- EARNSHAW, W. C., L. M. Martins, and S. H. Kaufmann. 1999. «Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis». Annual Reviews of Biochemistry, vol. 68, p. 383-424.
- EBERT, E. C. 2000. «IL-10 Enhances IL-2-Induced Proliferation and Cytotoxicity by Human Intestinal Lymphocytes». Clinical and Experimental of Immunology, vol. 119, no. 3, p. 426-32.
- ELLMIEIER, W., S. Sawada, and D. R. Littman. 1999. «The Regulation of CD4 and CD8 Coreceptor Gene Expression During T Cell Development». Annual Reviews of Immunology, vol. 17, p. 523-54.
- EPSTEIN, M. D., D. R. Banducci, and E. K. Manders. 1992. «The Role of the Gastrointestinal Tract in the Development of Burn Sepsis». Plastic and Reconstructive Surgery, vol. 90, no. 3, p. 524-31.
- FAIST, E., C. Schinkel, and S. Zimmer. 1996. «Update on the Mechanisms of Immune Suppression of Injury and Immune Modulation». World Journal of Surgery, vol. 20, no. 4, p. 454-9.
- FAUNCE, D. E., M. S. Gregory, and E. J. Kovacs. 1998. «Glucocorticoids Protect Against Suppression of T Cell Responses in a Murine Model of Acute Ethanol Exposure and Thermal Injury by Regulating IL-6». Journal of Leukocyte Biology, vol. 64, no. 6, p. 724-32.
- FIELDS, P. E., T. F. Gajewski, and F. W. Fitch. 1996. «Blocked Ras Activation in Anergic CD4+ T Cells». Science, vol. 271, no. 5253, p. 1276-8.
- FLYNN, J. L. and J. Chan. 2001. «Immunology of Tuberculosis». Annual Reviews of Immunology, vol. 19, p. 93-129.
- FOSSE, E., J. H. Trumpy, and A. Skulberg. 1987. «Alterations in T-Helper and T-Suppressor Lymphocyte Populations After Multiple Injuries». Injury, vol. 18, no. 3, p. 199-202.

- FUKUZUKA, K., C. K. Edwards 3rd, M. Clare-Salzler, E. M. Copeland 3rd, L. L. Moldawer, and D. W. Mozingo. 2000. «Glucocorticoid and Fas Ligand Induced Mucosal Lymphocyte Apoptosis After Burn Injury». Journal of Trauma, vol. 49, no. 4, p. 710-6.
- FUKUZUKA, K., C. K. Edwards 3rd, M. Clare-Salzler, E. M. Copeland 3rd, L. L. Moldawer, and D. W. Mozingo. 2000. «Glucocorticoid-Induced, Caspase-Dependent Organ Apoptosis Early After Burn Injury». American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, vol. 278, no. 4, p. R1005-18.
- FUKUZUKA, K., J. J. Rosenberg, G. C. Gaines, C. K. Edwards 3rd, M. Clare-Salzler, S. L. MacKay, L. L. Moldawer, E. M. Copeland 3rd, and D. W. Mozingo. 1999. «Caspase-3-Dependent Organ Apoptosis Early After Burn Injury». Annals of Surgery, vol. 229, no. 6, p. 851-8; discussion 858-9.
- GADD, M. A. and J. F. Hansbrough. 1990. «Postburn Suppression of Murine Lymphocyte and Neutrophil Functions Is Not Reversed by Prostaglandin Blockade». Journal of Surgery Research, vol. 48, no. 1, p. 84-90.
- GADD, M. A., J. F. Hansbrough, D. B. Hoyt, and N. Ozkan. 1989. «Defective T-Cell Surface Antigen Expression After Mitogen Stimulation. An Index of Lymphocyte Dysfunction After Controlled Murine Injury». Annals of Surgery, vol. 209, no. 1, p. 112-8.
- GADD, M. A., J. F. Hansbrough, C. S. Soderberg, and T. O. Field. 1988. «Antibody Formation After Murine Injury». Journal of Surgery Research, vol. 44, no. 6, p. 649-57.
- GAMELLI, R. L., M. George, M. Sharp-Pucci, D. J. Dries, and Z. Radisavljevic. 1995. «Burn-Induced Nitric Oxide Release in Humans». Journal of Trauma, vol. 39, no. 5, p. 869-77; discussion 877-8.
- GAMELLI, R. L., L. K. He, H. Liu, and J. D. Ricken. 1998. «Burn Wound Infection-Induced Myeloid Suppression: the Role of Prostaglandin E2, Elevated Adenylate Cyclase, and Cyclic Adenosine Monophosphate». Journal of Trauma, vol. 44, no. 3, p. 469-74.
- GAMELLI, R. L., L. K. He, and L. H. Liu. 2000. «Macrophage Mediated Suppression of Granulocyte and Macrophage Growth After Burn Wound Infection Reversal by Means of Anti-PGE2». Journal of Burn Care & Rehabilitation, vol. 21, no. 1 Pt 1, p. 64-9.
- GAMELLI, R. L., J. C. Hebert, and R. S. Foster Jr. 1985. «Effect of Burn Injury on Granulocyte and Macrophage Production». Journal of Trauma, vol. 25, no. 7, p. 615-9.
- GILL, R. G. 1993. «T-Cell-T-Cell Collaboration in Allograft Responses». Current Opinion in Immunology, vol. 5, no. 5, p. 782-7.
- GOEBEL, A., E. Kavanagh, A. Lyons, I. B. Saporoschetz, C. Soberg, J. A. Lederer, J. A. Mannick, and M. L. Rodrick. 2000. «Injury Induces Deficient Interleukin-12 Production, but Interleukin-12 Therapy After Injury Restores Resistance to Infection». Annals of Surgery, vol. 231, no. 2, p. 253-61.
- GOLDSBY, R.A., Kindt, T.J. et Osborne B.A., 2000, Immunologie – Le cours de Janis Kuby, Paris, Dunod Paris, 660p
- GOZALO-SANMILLAN, S., J. M. McNally, M. Y. Lin, C. A. Chambers, and L. J. Berg. 2001.

«Cutting Edge: Two Distinct Mechanisms Lead to Impaired T Cell Homeostasis in Janus Kinase 3- and CTLA-4-Deficient Mice». Journal of Immunology, vol. 166, no. 2, p. 727-30.

GRANUCCI, F., C. Vizzardelli, N. Pavelka, S. Feau, M. Persico, E. Virzi, M. Rescigno, G. Moro, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2001. «Inducible IL-2 Production by Dendritic Cells Revealed by Global Gene Expression Analysis». Nature Immunology, vol. 2, no. 9, p. 882-8.

GRBIC, J. T., J. A. Mannick, D. B. Gough, and M. L. Rodrick. 1991. «The Role of Prostaglandin E2 in Immune Suppression Following Injury». Annals of Surgery, vol. 214, no. 3, p. 253-62; discussion 262-3.

GREGORY, M. S., L. A. Duffner, E. L. Hahn, H. H. Tai, D. E. Faunce, and E. J. Kovacs. 2000. «Differential Production of Prostaglandin E(2) in Male and Female Mice Subjected to Thermal Injury Contributes to the Gender Difference in Immune Function: Possible Role for 15-Hydroxyprostaglandin Dhydrogenase». Cellular Immunology, vol. 205, no. 2, p. 94-102.

GREGORY, M. S., D. E. Faunce, L. A. Duffner, and E. J. Kovacs. 2000. «Gender Difference in Cell-Mediated Immunity After Thermal Injury Is Mediated, in Part, by Elevated Levels of Interleukin-6». Journal of Leukocyte Biology, vol. 67, no. 3, p. 319-26.

HAAS, W., P. Pereira, and S. Tonegawa. 1993. «Gamma/Delta Cells». Annual Reviews of Immunology, vol. 11, p. 637-85.

HAENEY, M. R. 1998. «The Role of the Complement Cascade in Sepsis». Journal Antimicrobial Chemotherapy, vol. 41 Suppl A, p. 41-6.

HAHN, E. L. and R. L. Gamelli. 2000. «Prostaglandin E2 Synthesis and Metabolism in Burn Injury and Trauma». Journal of Trauma, vol. 49, no. 6, p. 1147-54.

HAHN, E. L., H. H. Tai, L. K. He, and R. L. Gamelli. 1999. «Burn Injury With Infection Alters Prostaglandin E2 Synthesis and Metabolism». Journal of Trauma, vol. 47, no. 6, p. 1052-7; discussion 1057-9.

HAMANN, A., D. P. Andrew, D. Jablonski-Westrich, B. Holzmann, and E. C. Butcher. 1994. «Role of Alpha 4-Integrins in Lymphocyte Homing to Mucosal Tissues *in vivo*». Journal of Immunology, vol. 152, no. 7, p. 3282-93.

HANSBROUGH, J. F. and M. A. Gadd. 1989. «Temporal Analysis of Murine Lymphocyte Subpopulations by Monoclonal Antibodies and Dual-Color Flow Cytometry After Burn and Nonburn Injury». Surgery, vol. 106, no. 1, p. 69-80.

HARRIS, B. H. and J. A. Gelfand. 1995. «The Immune Response to Trauma». Seminar of Pediatric Surgery, vol. 4, no. 2, p. 77-82.

HART, D. N. 1997. «Dendritic Cells: Unique Leukocyte Populations Which Control the Primary Immune Response». Blood, vol. 90, no. 9, p. 3245-87.

HARTY, J. T., A. R. Tvinnereim, and D. W. White. 2000. «CD8+ T Cell Effector Mechanisms in Resistance to Infection». Annual Reviews of Immunology, vol. 18, p. 275-308.

HASSAN, J. and D. J. Reen. 1998. «IL-7 Promotes the Survival and Maturation but Not Differentiation of Human Post-Thymic CD4+ T Cells». European Journal of Immunology, vol. 28,

no. 10, p. 3057-65.

HE, L. K., L. H. Liu, E. Hahn, and R. L. Gamelli. 2001. «The Expression of Cyclooxygenase and the Production of Prostaglandin E2 in Neutrophils After Burn Injury and Infection». Journal of Burn Care & Rehabilitation, vol. 22, no. 1, p. 58-64.

HENGARTNER, M. O. and H. R. Horvitz. 1994. «Programmed Cell Death in *Caenorhabditis Elegans*». Current Opinion in Genetic Development, vol. 4, no. 4, p. 581-6.

HERMAN, A., J. W. Kappler, P. Marrack, and A. M. Pullen. 1991. «Superantigens: Mechanism of T-Cell Stimulation and Role in Immune Responses». Annual Reviews of Immunology, vol. 9, p. 745-72.

HIRAMATSU, M., R. S. Hotchkiss, I. E. Karl, and T. G. Buchman. 1997. «Cecal Ligation and Puncture (CLP) Induces Apoptosis in Thymus, Spleen, Lung, and Gut by an Endotoxin and TNF-Independent Pathway». Shock, vol. 7, no. 4, p. 247-53.

HO, I. C., M. R. Hodge, J. W. Rooney, and L. H. Glimcher. 1996. «The Proto-Oncogene C-Maf Is Responsible for Tissue-Specific Expression of Interleukin-4». Cell, vol. 85, no. 7, p. 973-83.

HOFMANN, K., P. Bucher, and J. Tschopp. 1997. «The CARD Domain: a New Apoptotic Signalling Motif». Trends of Biochemistry Science, vol. 22, no. 5, p. 155-6.

HORGAN, A. F., M. V. Mendez, D. S. O'Riordain, R. G. Holzheimer, J. A. Mannick, and M. L. Rodrick. 1994. «Altered Gene Transcription After Burn Injury Results in Depressed T- Lymphocyte Activation». Annals of Surgery, vol. 220, no. 3, p. 342-51; discussion 351-2.

HU, Y., M. A. Benedict, D. Wu, N. Inohara, and G. Nunez. 1998. «Bcl-XL Interacts With Apaf-1 and Inhibits Apaf-1-Dependent Caspase-9 Activation». Proceedings of National Academy Sciences U S A, vol. 95, no. 8, p. 4386-91.

HUNIG, T. and M. J. Bevan. 1981. «Specificity of T-Cell Clones Illustrates Altered Self Hypothesis». Nature, vol. 294, no. 5840, p. 460-2.

HUNT, J. P., C. T. Hunter, M. R. Brownstein, A. Giannopoulos, C. S. Hultman, S. deSerres, L. Bracey, J. Frelinger, and A. A. Meyer. 1998. «The Effector Component of the Cytotoxic T-Lymphocyte Response Has a Biphasic Pattern After Burn Injury». Journal of Surgery Research, vol. 80, no. 2, p. 243-51.

HUSSAIN, S. F., C. F. Anderson, and D. L. Farber. 2002. «Differential SLP-76 Expression and TCR-Mediated Signaling in Effector and Memory CD4 T Cells». Journal of Immunology, vol. 168, no. 4, p. 1557-65.

IRMLER, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J. L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L. E. French, and J. Tschopp. 1997. «Inhibition of Death Receptor Signals by Cellular FLIP». Nature, vol. 388, no. 6638, p. 190-5.

ITOH, N. and S. Nagata. 1993. «A Novel Protein Domain Required for Apoptosis. Mutational Analysis of Human Fas Antigen». Journal of Biological Chemistry, vol. 268, no. 15, p. 10932-7.

JACOBS, H., H. Von Boehmer, C. J. Melief, and A. Berns. 1990. «Mutations in the Major Histocompatibility Complex Class I Antigen- Presenting Groove Affect Both Negative and Positive

- Selection of T Cells». European Journal of Immunology, vol. 20, no. 10, p. 2333-7.
- JANEWAY, C. A. Jr and R. Medzhitov. 2002. «Innate Immune Recognition». Annual Reviews of Immunology, vol. 20, p. 197-216.
- JENKINS, M. K., A. Khoruts, E. Ingulli, D. L. Mueller, S. J. McSorley, R. L. Reinhardt, A. Itano, and K. A. Pape. 2001. «*In vivo* Activation of Antigen-Specific CD4 T Cells». Annual Reviews of Immunology, vol. 19, p. 23-45.
- JENKINS, M. K., D. M. Pardoll, J. Mizuguchi, T. M. Chused, and R. H. Schwartz. 1987. «Molecular Events in the Induction of a Nonresponsive State in Interleukin 2-Producing Helper T-Lymphocyte Clones». Proceedings of National Academy Sciences U S A, vol. 84, no. 15, p. 5409-13.
- JENKINS, M. K. and R. H. Schwartz. 1987. «Antigen Presentation by Chemically Modified Splenocytes Induces Antigen-Specific T Cell Unresponsiveness *in vitro* and *in vivo*». Journal of Experimental Medicine, vol. 165, no. 2, p. 302-19.
- JOBIN, N., D. Garrel, and J. Bernier. 2000a. «Increased Serum-Soluble Interleukin-2 Receptor in Burn Patients: Characterization and Effects on the Immune System». Human Immunology, vol. 61, no. 3, p. 233-46.
- JOBIN, N., D. R. Garrel, and J. Bernier. 2000. «Increased Burn-Induced Immunosuppression in Lipopolysaccharide-Resistant Mice». Cellular Immunology, vol. 200, no. 2, p. 65-75.
- JOBIN, N., D. R. Garrel, J. Champoux, and J. Bernier. 2000. «Improved Immune Functions With Administration of a Low-Fat Diet in a Burn Animal Model». Cellular Immunology, vol. 206, no. 2, p. 71-84.
- JONES, R. J. a. L. E. J. 1963. «Staphylococcal Antibodies in Burned Patients». British Journal of Experimental Pathology, vol. 44, p. 576.
- KABELITZ, D. and S. Wesselborg. 1992. «Life and Death of a Superantigen-Reactive Human CD4+ T Cell Clone: Staphylococcal Enterotoxins Induce Death by Apoptosis but Simultaneously Trigger a Proliferative Response in the Presence of HLA-DR+ Antigen-Presenting Cells». International Immunology, vol. 4, no. 12, p. 1381-8.
- KAGAN, R. J., A. Bratescu, O. Jonasson, T. Matsuda, and M. Teodorescu. 1989. «The Relationship Between the Percentage of Circulating B Cells, Corticosteroid Levels, and Other Immunologic Parameters in Thermally Injured Patients». Journal of Trauma, vol. 29, no. 2, p. 208-13.
- KAMOGAWA, Y., L. A. Minasi, S. R. Carding, K. Bottomly, and R. A. Flavell. 1993. «The Relationship of IL-4- and IFN Gamma-Producing T Cells Studied by Lineage Ablation of IL-4-Producing Cells». Cell, vol. 75, no. 5, p. 985-95.
- KANG, S. M., B. Beverly, A. C. Tran, K. Brorson, R. H. Schwartz, and M. J. Lenardo. 1992. «Transactivation by AP-1 Is a Molecular Target of T Cell Clonal Anergy». Science, vol. 257, no. 5073, p. 1134-8.
- KAPLAN, M. H., Y. L. Sun, T. Hoey, and M. J. Grusby. 1996. «Impaired IL-12 Responses and Enhanced Development of Th2 Cells in Stat4-Deficient Mice». Nature, vol. 382, no. 6587, p. 174-7.

- KATARANOVSKI, M., J. Kucuk, D. Lilic, B. Draskovic-Pavlovic, M. Colic, N. Pejnovic, and A. Dujic. 1992. «Increased Activity of Lymph Node Cells in Thermal Injury». Regulatory Immunology, vol. 4, no. 4, p. 197-203.
- KAUR, K., S. G. Harris, J. Padilla, B. A. Graf, and R. P. Phipps. 1999. «Prostaglandin E2 As a Modulator of Lymphocyte Mediated Inflammatory and Humoral Responses». Advances in Experimental Medicine Biology, vol. 469, p. 409-12.
- KAVANAGH, E. G., J. L. Kelly, A. Lyons, C. C. Soberg, J. A. Mannick, and J. A. Lederer. 1998. «Burn Injury Primes Naive CD4+ T Cells for an Augmented T-Helper 1 Response». Surgery, vol. 124, no. 2, p. 269-76; discussion 276-7.
- KAVANAGH, E. K., M. R. Kell, A. Goebel, C. C. Soberg, J. A. Mannick, and J. A. Lederer. 1999. «Interleukin 10 Is Not Essential for Survival or for Modulating T-Cell Function After Injury». Surgery, vol. 126, no. 2, p. 456-62.
- KEATING, M. J., V. Rodriguez, and G. P. Bodey. 1977. «Protected Environments and Microbial Suppression in Cancer Therapy». American Journal of Clinical Nutrition, vol. 30, no. 11, p. 1904-10.
- KELL, M. R., E. G. Kavanaugh, A. Goebel, C. C. Soberg, and J. A. Lederer. 1999. «Injury Primes the Immune System for an Enhanced and Lethal T-Cell Response Against Bacterial Superantigen». Shock, vol. 12, no. 2, p. 139-44.
- KELL, M. R., O. Shelley, J. A. Mannick, Z. Guo, and J. A. Lederer. 2000. «A Central Role for CD95 (Fas) in T-Cell Reactivity After Injury». Surgery, vol. 128, no. 2, p. 159-64.
- KELLY, J. L., A. Lyons, C. C. Soberg, J. A. Mannick, and J. A. Lederer. 1997. «Anti-Interleukin-10 Antibody Restores Burn-Induced Defects in T-Cell Function». Surgery, vol. 122, no. 2, p. 146-52.
- KELLY, J. L., C. B. O'Suilleabhain, C. C. Soberg, J. A. Mannick, and J. A. Lederer. 1999. «Severe Injury Triggers Antigen-Specific T-Helper Cell Dysfunction». Shock, vol. 12, no. 1, p. 39-45.
- KIANI, A., J. P. Viola, A. H. Lichtman, and A. Rao. 1997. «Down-Regulation of IL-4 Gene Transcription and Control of Th2 Cell Differentiation by a Mechanism Involving NFAT1». Immunity, vol. 7, no. 6, p. 849-60.
- KIM, Y. M., R. V. Talanian, and T. R. Billiar. 1997. «Nitric Oxide Inhibits Apoptosis by Preventing Increases in Caspase-3- Like Activity Via Two Distinct Mechanisms». Journal of Biological Chemistry, vol. 272, no. 49, p. 31138-48.
- KIMURA, M., M. Yamashita, M. Kubo, M. Iwashima, C. Shimizu, K. Tokoyoda, J. Chiba, M. Taniguchi, M. Katsumata, and T. Nakayama. 2000. «Impaired Ca/Calcineurin Pathway in *in vivo* Anergized CD4 T Cells». International Immunology, vol. 12, no. 6, p. 817-24.
- KONDO, T., I. Cortese, S. Markovic-Plese, K. P. Wandinger, C. Carter, M. Brown, S. Leitman, and R. Martin. 2001. «Dendritic Cells Signal T Cells in the Absence of Exogenous Antigen». Nature Immunology, vol. 2, no. 10, p. 932-8.
- KONIG, W., B. Schluter, J. Scheffer, and M. Koller. 1992. «Microbial Pathogenicity and Host Defense in Burned Patients--the Role of Inflammatory Mediators». Infection, vol. 20 Suppl 2, p.

S128-34.

KORB, L. C., S. Mirshahidi, K. Ramyar, A. A. Sadighi Akha, and S. Sadegh-Nasseri. 1999. «Induction of T Cell Anergy by Low Numbers of Agonist Ligands». Journal of Immunology, vol. 162, no. 11, p. 6401-9.

KOTANIDES, H. and N. C. Reich. 1996. «Interleukin-4-Induced STAT6 Recognizes and Activates a Target Site in the Promoter of the Interleukin-4 Receptor Gene». Journal of Biological Chemistry, vol. 271, no. 41, p. 25555-61.

KUO, C. T. and J. M. Leiden. 1999. «Transcriptional Regulation of T Lymphocyte Development and Function». Annual Reviews of Immunology, vol. 17, p. 149-87.

KUPPER, T. S., E. A. Deitch, C. C. Baker, and W. C. Wong. 1986. «The Human Burn Wound As a Primary Source of Interleukin-1 Activity». Surgery, vol. 100, no. 2, p. 409-15.

KUPPER, T. S., D. R. Green, S. K. Durum, and C. C. Baker. 1985. «Defective Antigen Presentation to a Cloned T Helper Cell by Macrophages From Burned Mice Can Be Restored With Interleukin-1». Surgery, vol. 98, no. 2, p. 199-206.

LAWRENCE, M. H., H. F. de Riesthal, and S. E. Calvano. 1996. «Changes in Memory and Naive CD4+ Lymphocytes in Lymph Nodes and Spleen After Thermal Injury». Journal of Burn Care & Rehabilitation, vol. 17, no. 1, p. 1-6.

LENSCHOW, D. J., Y. Zeng, J. R. Thistlethwaite, A. Montag, W. Brady, M. G. Gibson, P. S. Linsley, and J. A. Bluestone. 1992. «Long-Term Survival of Xenogeneic Pancreatic Islet Grafts Induced by CTLA4lg». Science, vol. 257, no. 5071, p. 789-92.

LEUNG, D. T., S. Morefield, and D. M. Willerford. 2000. «Regulation of Lymphoid Homeostasis by IL-2 Receptor Signals *in vivo*». Journal of Immunology, vol. 164, no. 7, p. 3527-34.

LI, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri, and X. Wang. 1997. «Cytochrome c and DATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade». Cell, vol. 91, no. 4, p. 479-89.

LI, W., C. D. Whaley, A. Mondino, and D. L. Mueller. 1996. «Blocked Signal Transduction to the ERK and JNK Protein Kinases in Anergic CD4+ T Cells». Science, vol. 271, no. 5253, p. 1272-6.

LIEDBERG C.F. 1961. «Antibacterial Resistance in Burns: II. The Effect on Unspecific Humoral Defense Mechanisms, Phagocytosis, and the Development of Bacteremia; An Experimental Study in the Guinea Pig.». Acta Chirurgica Scandinavica, vol. 121, p. 351.

LO, S. K., P. A. Detmers, S. M. Levin, and S. D. Wright. 1989. «Transient Adhesion of Neutrophils to Endothelium». Journal of Experimental Medicine, vol. 169, no. 5, p. 1779-93.

LUDEWIG, B., S. Oehen, F. Barchiesi, R. A. Schwendener, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1999. «Protective Antiviral Cytotoxic T Cell Memory Is Most Efficiently Maintained by Restimulation Via Dendritic Cells». Journal of Immunology, vol. 163, no. 4, p. 1839-44.

LYONS, A., J. L. Kelly, M. L. Rodrick, J. A. Mannick, and J. A. Lederer. 1997. «Major Injury Induces Increased Production of Interleukin-10 by Cells of the Immune System With a Negative Impact on Resistance to Infection». Annals of Surgery, vol. 226, no. 4, p. 450-8; discussion 458-60.

- MACKAY, C. R., W. L. Marston, and L. Dudler. 1990. «Naive and Memory T Cells Show Distinct Pathways of Lymphocyte Recirculation». Journal of Experimental Medicine, vol. 171, no. 3, p. 801-17.
- MADIHALLY, S. V., M. Toner, M. L. Yarmush, and R. N. Mitchell. 2001. «Peripheral Blood Mononuclear Cells Exhibit Hypercatabolic Activity in Response to Thermal Injury Correlating With Diminished MHC I Expression». Journal of Trauma, vol. 50, no. 3, p. 500-9.
- MAEKAWA, T., H. Kajihara, K. Okabayashi, M. Otani, and O. Yuge. 2002. «Impairment of Splenic B and T Lymphocytes in the Early Period After Severe Thermal Injury: Immunohistochemical and Electron Microscopic Analysis». Burns, vol. 28, no. 4, p. 329-39.
- MALDONADO-LOPEZ, R. and M. Moser. 2001. «Dendritic Cell Subsets and the Regulation of Th1/Th2 Responses». Seminars in Immunology, vol. 13, no. 5, p. 275-82.
- MALDONADO, M. D., A. Venturoli, A. Franco, and A. Nunez-Roldan. 1991. «Specific Changes in Peripheral Blood Lymphocyte Phenotype From Burn Patients. Probable Origin of the Thermal Injury-Related Lymphocytopenia». Burns, vol. 17, no. 3, p. 188-92.
- MAROTTA, P. S. L. D. R. M. 1992. «Modulation of the Induction of Nitric Oxide Synthase by Eicosanoids in the Murine Macrophage Cell Line J774». British Journal of Pharmacology, vol. 107, p. 640-641.
- MARRACK, P., J. Bender, D. Hildeman, M. Jordan, T. Mitchell, M. Murakami, A. Sakamoto, B. C. Schaefer, B. Swanson, and J. Kappler. 2000. «Homeostasis of Alpha Beta TCR+ T Cells». Nature Immunology, vol. 1, no. 2, p. 107-11.
- MASSON, I., J. Mathieu, X. B. Nolland, M. De Sousa, B. Chanaud, S. Strzalko, Y. Chancerelle, J. F. Kergonou, J. P. Giroud, and I. Florentin. 1998. «Role of Nitric Oxide in Depressed Lymphoproliferative Responses and Altered Cytokine Production Following Thermal Injury in Rats». Cellular Immunology, vol. 186, no. 2, p. 121-32.
- MCIRVINE, A. J., J. B. O'Mahony, I. Saporoschetz, and J. A. Mannick. 1982. «Depressed Immune Response in Burn Patients: Use of Monoclonal Antibodies and Functional Assays to Define the Role of Suppressor Cells». Annals of Surgery, vol. 196, no. 3, p. 297-304.
- MCRIPLEY, R. J. a. G. D. W. E. o. b. i. r. o. d. m. a. P. a. 1965. «Journal of Infectious Diseases». vol. 115, p. 159.
- MEDZHITOV, R. and C. A. Janeway Jr. 1997. «Innate Immunity: Impact on the Adaptive Immune Response». Current Opinion in Immunology, vol. 9, no. 1, p. 4-9.
- MEDZHITOV, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway Jr. 1997. «A Human Homologue of the Drosophila Toll Protein Signals Activation of Adaptive Immunity». Nature, vol. 388, no. 6640, p. 394-7.
- MIETHKE, T., R. Vabulas, R. Bittlingmaier, K. Heeg, and H. Wagner. 1996. «Mechanisms of Peripheral T Cell Deletion: Anergized T Cells Are Fas Resistant but Undergo Proliferation-Associated Apoptosis». European Journal of Immunology, vol. 26, no. 7, p. 1459-67.
- MILLER-GRAZIANO CL, Fink M. W. J. 1988. «Mechanisms of Altered Monocyte Prostaglandin E₂ Production in Severely Injured Patients». Archives of Surgery, vol. 123, p. 293-299.

- MONDINO, A., C. D. Whaley, D. R. DeSilva, W. Li, M. K. Jenkins, and D. L. Mueller. 1996. «Defective Transcription of the IL-2 Gene Is Associated With Impaired Expression of C-Fos, FosB, and JunB in Anergic T Helper 1 Cells». Journal of Immunology, vol. 157, no. 5, p. 2048-57.
- MOORE, F. D. Jr, C. Davis, M. Rodrick, J. A. Mannick, and D. T. Fearon. 1986. «Neutrophil Activation in Thermal Injury As Assessed by Increased Expression of Complement Receptors». New England Journal of Medicine, vol. 314, no. 15, p. 948-53.
- MORAN, K. and A. M. Munster. 1987. «Alterations of the Host Defense Mechanism in Burned Patients». Surgical Clinics of North America, vol. 67, no. 1, p. 47-56.
- MOUNTZ, J. D., T. Zhou, J. Wu, W. Wang, X. Su, and J. Cheng. 1995. «Regulation of Apoptosis in Immune Cells». Journal of Clinical Immunology, vol. 15, no. 1, p. 1-16.
- MUELLER, D. L., L. Chiodetti, P. A. Bacon, and R. H. Schwartz. 1991. «Clonal Anergy Blocks the Response to IL-4, As Well As the Production of IL-2, in Dual-Producing T Helper Cell Clones». Journal of Immunology, vol. 147, no. 12, p. 4118-25.
- MURPHY, K. M., W. Ouyang, J. D. Farrar, J. Yang, S. Ranganath, H. Asnagli, M. Afkarian, and T. L. Murphy. 2000. «Signaling and Transcription in T Helper Development». Annual Reviews of Immunology, vol. 18, p. 451-94.
- NAGATA, S. and P. Golstein. 1995. «The Fas Death Factor». Science, vol. 267, no. 5203, p. 1449-56.
- NEGULESCU, P. A., N. Shastri, and M. D. Cahalan. 1994. «Intracellular Calcium Dependence of Gene Expression in Single T Lymphocytes». Proceedings of National Academy Sciences U S A, vol. 91, no. 7, p. 2873-7.
- NELSON, R. D., S. R. Hasslen, D. H. Ahrenholz, and L. D. Solem. 1987. «Mechanisms of Loss of Human Neutrophil Chemotaxis Following Thermal Injury». Journal of Burn Care & Rehabilitation, vol. 8, no. 6, p. 496-502.
- NIKOLIC-ZUGIC, J. and M. J. Bevan. 1990. «Role of Self-Peptides in Positively Selecting the T-Cell Repertoire». Nature, vol. 344, no. 6261, p. 65-7.
- NINNEMANN, J. L. 1987. «Trauma, Sepsis, and the Immune Response». Journal of Burn Care & Rehabilitation, vol. 8, no. 6, p. 462-8.
- NINNEMANN, J. L., J. C. Fisher, and H. A. Frank. 1978. «Prolonged Survival of Human Skin Allografts Following Thermal Injury». Transplantation, vol. 25, no. 2, p. 69-72.
- NISHIMURA, H., M. Emoto, K. Hiromatsu, S. Yamamoto, K. Matsuura, H. Gomi, T. Ikeda, S. Itohara, and Y. Yoshikai. 1995. «The Role of Gamma Delta T Cells in Priming Macrophages to Produce Tumor Necrosis Factor-Alpha». European Journal of Immunology, vol. 25, no. 5, p. 1465-8.
- NOH, D. Y., S. H. Shin, and S. G. Rhee. 1995. «Phosphoinositide-Specific Phospholipase C and Mitogenic Signaling». Biochimica & Biophysica Acta, vol. 1242, no. 2, p. 99-113.
- NOSSAL, G. J. and B. L. Pike. 1980. «Clonal Anergy: Persistence in Tolerant Mice of Antigen-Binding B Lymphocytes Incapable of Responding to Antigen or Mitogen». Proceedings of National

Academy Sciences U S A, vol. 77, no. 3, p. 1602-6.

O'MAHONY, J. B., S. B. Palder, J. J. Wood, A. McIrvine, M. L. Rodrick, R. H. Demling, and J. A. Mannick. 1984. «Depression of Cellular Immunity After Multiple Trauma in the Absence of Sepsis». Journal of Trauma, vol. 24, no. 10, p. 869-75.

O'MAHONY, J. B., J. J. Wood, M. L. Rodrick, and J. A. Mannick. 1985. «Changes in T Lymphocyte Subsets Following Injury. Assessment by Flow Cytometry and Relationship to Sepsis». Annals of Surgery, vol. 202, no. 5, p. 580-6.

O'RIORDAIN, D. S., M. V. Mendez, R. G. Holzheimer, K. Collins, J. A. Mannick, and M. L. Rodrick. 1995. «Interleukin-2 Receptor Expression and Function Following Thermal Injury». Archives of Surgery, vol. 130, no. 2, p. 165-70.

O'RIORDAIN, D. S., M. V. Mendez, M. G. O'Riordain, R. G. Molloy, R. G. Holzheimer, K. Collins, I. Saporoschetz, J. A. Mannick, and M. L. Rodrick. 1993. «Molecular Mechanisms of Decreased Interleukin-2 Production After Thermal Injury». Surgery, vol. 114, no. 2, p. 407-14; discussion 414-5.

O'SUILLEABHAIN, C., S. T. O'Sullivan, J. L. Kelly, J. Lederer, J. A. Mannick, and M. L. Rodrick. 1996. «Interleukin-12 Treatment Restores Normal Resistance to Bacterial Challenge After Burn Injury». Surgery, vol. 120, no. 2, p. 290-6.

O'SUILLEABHAIN, C. B., S. Kim, M. R. Rodrick, J. A. Mannick, and J. A. Lederer. 2001. «Injury Induces Alterations in T-Cell NFkappaB and AP-1 Activation». Shock, vol. 15, no. 6, p. 432-7.

O'SULLIVAN, S. T., J. A. Lederer, A. F. Horgan, D. H. Chin, J. A. Mannick, and M. L. Rodrick. 1995. «Major Injury Leads to Predominance of the T Helper-2 Lymphocyte Phenotype and Diminished Interleukin-12 Production Associated With Decreased Resistance to Infection». Annals of Surgery, vol. 222, no. 4, p. 482-90; discussion 490-2.

O'SULLIVAN, S. T. and T. P. O'Connor. 1997. «Immunosuppression Following Thermal Injury: the Pathogenesis of Immunodysfunction». British Journal of Plastic Surgery, vol. 50, no. 8, p. 615-23.

OGLE, C. K., X. Guo, K. Szczur, S. Hartmann, and J. D. Ogle. 1994. «Production of Tumor Necrosis Factor, Interleukin-6 and Prostaglandin E2 by LPS-Stimulated Rat Bone Marrow Macrophages After Thermal Injury: Effect of Indomethacin». Inflammation, vol. 18, no. 2, p. 175-85.

OKA, M., K. Hirazawa, K. Yamamoto, N. Iizuka, S. Hazama, T. Suzuki, and N. Kobayashi. 1996. «Induction of Fas-Mediated Apoptosis on Circulating Lymphocytes by Surgical Stress». Annals of Surgery, vol. 223, no. 4, p. 434-40.

ORGAN, B. C., A. C. Antonacci, J. Chiao, J. Chiao, A. Kumar, H. F. de Riesthal, L. Yuan, D. Black, and S. E. Calvano. 1989. «Changes in Lymphocyte Number and Phenotype in Seven Lymphoid Compartments After Thermal Injury». Annals of Surgery, vol. 210, no. 1, p. 78-89.

OTTEN, G. R. and R. N. Germain. 1991. «Split Anergy in a CD8+ T Cell: Receptor-Dependent Cytolysis in the Absence of Interleukin-2 Production». Science, vol. 251, no. 4998, p. 1228-31.

PAPACONSTANTINO, H. T., K. O. Hwang, S. Rajaraman, M. R. Hellmich, C. M. Townsend Jr,

- and T. C. Ko. 1998. «Glutamine Deprivation Induces Apoptosis in Intestinal Epithelial Cells». Surgery, vol. 124, no. 2, p. 152-9; discussion 159-60.
- PATEL, R., M. G. Attur, M. Dave, S. B. Abramson, and A. R. Amin. 1999. «Regulation of Cytosolic COX-2 and Prostaglandin E2 Production by Nitric Oxide in Activated Murine Macrophages». Journal of Immunology, vol. 162, no. 7, p. 4191-7.
- PELLEGRINI, J. D., A. K. De, K. Kodys, J. C. Puyana, R. K. Furse, and C. Miller-Graziano. 2000. «Relationships Between T Lymphocyte Apoptosis and Anergy Following Trauma». Journal of Surgery Research, vol. 88, no. 2, p. 200-6.
- POWELL, J. D., J. A. Ragheb, S. Kitagawa-Sakakida, and R. H. Schwartz. 1998. «Molecular Regulation of Interleukin-2 Expression by CD28 Co-Stimulation and Anergy». Immunology Reviews, vol. 165, p. 287-300.
- PREISER, J. C., P. Reper, D. Vlasselaer, B. Vray, H. Zhang, G. Metz, A. Vanderkelen, and J. L. Vincent. 1996. «Nitric Oxide Production Is Increased in Patients After Burn Injury». Journal of Trauma, vol. 40, no. 3, p. 368-71.
- PRUETT, S. B. and R. Fan. 2001. «Quantitative Modeling of Suppression of IgG1, IgG2a, IL-2, and IL-4 Responses to Antigen in Mice Treated With Exogenous Corticosterone or Restraint Stress». Journal of Toxicology and Environmental Health, vol. 62, no. 3, p. 175-89.
- QUILL, H., A. Bhandoola, G. Trinchieri, J. Haluskey, and D. Peritt. 1994. «Induction of Interleukin 12 Responsiveness Is Impaired in Anergic T Lymphocytes». Journal of Experimental Medicine, vol. 179, no. 3, p. 1065-70.
- QUILL, H. and R. H. Schwartz. 1987. «Stimulation of Normal Inducer T Cell Clones With Antigen Presented by Purified Ia Molecules in Planar Lipid Membranes: Specific Induction of a Long-Lived State of Proliferative Nonresponsiveness». Journal of Immunology, vol. 138, no. 11, p. 3704-12.
- RANDOLPH, G. J. 2001. «Dendritic Cell Migration to Lymph Nodes: Cytokines, Chemokines, and Lipid Mediators». Seminars in Immunology, vol. 13, no. 5, p. 267-74.
- RATHMELL, J. C. and C. B. Thompson. 1999. «The Central Effectors of Cell Death in the Immune System». Annual Reviews of Immunology, vol. 17, p. 781-828.
- RIBEIRO, C. A., C. Andrade, C. A. Polanczyk, and N. Clausell. 2002. «Association Between Early Detection of Soluble TNF-Receptors and Mortality in Burn Patients». Intensive Care of Medicine, vol. 28, no. 4, p. 472-8.
- ROY, N., Q. L. Deveraux, R. Takahashi, G. S. Salvesen, and J. C. Reed. 1997. «The C-IAP-1 and C-IAP-2 Proteins Are Direct Inhibitors of Specific Caspases». EMBO J, vol. 16, no. 23, p. 6914-25.
- RUBIN, L. A., C. C. Kurman, M. E. Fritz, W. E. Biddison, B. Boutin, R. Yarchoan, and D. L. Nelson. 1985. «Soluble Interleukin 2 Receptors Are Released From Activated Human Lymphoid Cells *in vitro*». Journal of Immunology, vol. 135, no. 5, p. 3172-7.
- S. T. O'SULLIVAN AND T.P. F. O'CONNOR. 1997. «Immunosuppression Following Thermal Injury: the Pathogenesis of Immunodysfunction». British Journal of Plastic Surgery, vol. 50, p. 615-23.

- SALO, M., J. Merikanto, J. Eskola, S. Nieminen, and A. J. Aho. 1979. «Impaired Lymphocyte Transformation After Accidental Trauma». Acta Chirurgica Scandinavica, vol. 145, no. 6, p. 367-72.
- SANTANGELO, S., R. L. Gamelli, and R. Shankar. 2001. «Myeloid Commitment Shifts Toward Monocytopoiesis After Thermal Injury and Sepsis». Annals of Surgery, vol. 233, no. 1, p. 97-106.
- SCHLUTER, B., W. Konig, M. Koller, G. Erbs, and F. E. Muller. 1991. «Differential Regulation of T- and B-Lymphocyte Activation in Severely Burned Patients». Journal of Trauma, vol. 31, no. 2, p. 239-46.
- SCHLUTER, B., W. Konig, M. Koller, G. Erbs, and F. E. Muller. 1990. «Studies on B-Lymphocyte Dysfunctions in Severely Burned Patients». Journal of Trauma, vol. 30, no. 11, p. 1380-9.
- SCHWACHA, M. G., A. Ayala, and I. H. Chaudry. 2000. «Insights into the Role of Gammadelta T Lymphocytes in the Immunopathogenic Response to Thermal Injury». Journal of Leukocyte Biology, vol. 67, no. 5, p. 644-50.
- SCHWACHA, M. G., A. Ayala, W. G. Cioffi, K. I. Bland, and 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, no. 1, p. 45-53.
- SCHWACHA, M. G. and I. H. Chaudry. 2002. «The Cellular Basis of Post-Burn Immunosuppression: Macrophages and Mediators». International Journal of Molecular Medicine, vol. 10, no. 3, p. 239-43.
- SCHWACHA, M. G., T. S. Samy, R. A. Catania, and I. H. Chaudry. 1998. «Thermal Injury Alters Macrophage Responses to Prostaglandin E2: Contribution to the Enhancement of Inducible Nitric Oxide Synthase Activity». Journal of Leukocyte Biology, vol. 64, no. 6, p. 740-6.
- SCHWACHA, M. G., C. P. Schneider, and I. H. Chaudry. 2002. «Differential Expression and Tissue Compartmentalization of the Inflammatory Response Following Thermal Injury». Cytokine, vol. 17, no. 5, p. 266-74.
- SCHWACHA, M. G. and S. D. Somers. 1999. «Thermal Injury-Induced Enhancement of Oxidative Metabolism by Mononuclear Phagocytes». Journal of Burn Care & Rehabilitation, vol. 20, no. 1 Pt 1, p. 37-41.
- SCHWACHA, M. G. and S. D. Somers. 1998. «Thermal Injury-Induced Immunosuppression in Mice: the Role of Macrophage-Derived Reactive Nitrogen Intermediates». Journal of Leukocyte Biology, vol. 63, no. 1, p. 51-8.
- SCHWARTZ, R. H. 1996. «Models of T Cell Anergy: Is There a Common Molecular Mechanism?». Journal of Experimental Medicine, vol. 184, no. 1, p. 1-8.
- SEBZDA, E., S. Mariathasan, T. Ohteki, R. Jones, M. F. Bachmann, and P. S. Ohashi. 1999. «Selection of the T Cell Repertoire». Annual Reviews of Immunology, vol. 17, p. 829-74.
- SHOUP, M., L. K. He, H. Liu, R. Shankar, and R. Gamelli. 1998. «Cyclooxygenase-2 Inhibitor NS-398 Improves Survival and Restores Leukocyte Counts in Burn Infection». Journal of Trauma, vol. 45, no. 2, p. 215-20; discussion 220-1.

- SLOAN-LANCASTER, J., B. D. Evavold, and P. M. Allen. 1993. «Induction of T-Cell Anergy by Altered T-Cell-Receptor Ligand on Live Antigen-Presenting Cells». Nature, vol. 363, no. 6425, p. 156-9.
- SNYDER, D. S. and E. R. Unanue. 1982. «Corticosteroids Inhibit Murine Macrophage Ia Expression and Interleukin 1 Production». Journal of Immunology, vol. 129, no. 5, p. 1803-5.
- SOLOMKIN, J. S. 1990. «Neutrophil Disorders in Burn Injury: Complement, Cytokines, and Organ Injury». Journal of Trauma, vol. 30, no. 12 Suppl, p. S80-5.
- SOLOMKIN, J. S., R. D. Nelson, D. E. Chenoweth, L. D. Solem, and R. L. Simmons. 1984. «Regulation of Neutrophil Migratory Function in Burn Injury by Complement Activation Products». Annals of Surgery, vol. 200, no. 6, p. 742-6.
- SPARKES, B. G. 1993. «Mechanisms of Immune Failure in Burn Injury». Vaccine, vol. 11, no. 5, p. 504-10.
- STEPHAN, R. N., P. J. Conrad, M. Saizawa, R. E. Dean, and I. H. Chaudry. 1988. «Prostaglandin E2 Depresses Antigen-Presenting Cell Function of Peritoneal Macrophages». Journal of Surgery Research, vol. 44, no. 6, p. 733-9.
- STRONG, V. E., J. Winter, Z. Yan, G. P. Smyth, J. R. Mestre, S. Maddali, P. A. Schaefer, R. W. Yurt, P. P. Stapleton, and J. M. Daly. 2001. «Prostaglandin E2 Receptors EP2 and EP4 Are Down-Regulated in Human Mononuclear Cells After Injury». Surgery, vol. 130, no. 2, p. 249-55.
- SUGIMOTO, M., M. Shimaoka, K. Hosotsubo, H. Tanigami, N. Taenaka, H. Kiyono, and I. Yoshiya. 1998. «Up-Regulation of Fas Ligand (FasL) mRNA Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) After Major Surgery». Clinical and Experimental of Immunology, vol. 112, no. 1, p. 120-5.
- SUNDSTEDT, A. and M. Dohlsten. 1998. «*In vivo* Anergized CD4+ T Cells Have Defective Expression and Function of the Activating Protein-1 Transcription Factor». Journal of Immunology, vol. 161, no. 11, p. 5930-6.
- TAAMS, L. S., W. van Eden, and M. H. Wauben. 1999. «Dose-Dependent Induction of Distinct Anergic Phenotypes: Multiple Levels of T Cell Anergy». Journal of Immunology, vol. 162, no. 4, p. 1974-81.
- TAAMS, L. S., A. J. van Rensen, M. C. Poelen, C. A. van Els, A. C. Besseling, J. P. Wagenaar, W. van Eden, and M. H. Wauben. 1998. «Anergic T Cells Actively Suppress T Cell Responses Via the Antigen- Presenting Cell». European Journal of Immunology, vol. 28, no. 9, p. 2902-12.
- TAMURA, T., S. Ueda, M. Yoshida, M. Matsuzaki, H. Mohri, and T. Okubo. 1996. «Interferon-Gamma Induces Ice Gene Expression and Enhances Cellular Susceptibility to Apoptosis in the U937 Leukemia Cell Line». Biochemical & Biophysical Research Community, vol. 229, no. 1, p. 21-6.
- TANCHOT, C., M. M. Rosado, F. Agenes, A. A. Freitas, and B. Rocha. 1997. «Lymphocyte Homeostasis». Seminars in Immunology, vol. 9, no. 6, p. 331-7.
- TELANDER, D. G. and D. L. Mueller. 1997. «Impaired Lymphokine Secretion in Anergic CD4+ T Cells Leads to Defective Help for B Cell Growth and Differentiation». Journal of Immunology, vol.

158, no. 10, p. 4704-13.

TEODORCZYK-INJEYAN, J. A., M. Cembrzynska-Nowak, S. Lalani, W. J. Peters, and G. B. Mills. 1995. «Immune Deficiency Following Thermal Trauma Is Associated With Apoptotic Cell Death». Journal of Clinical Immunology, vol. 15, no. 6, p. 318-28.

TEODORCZYK-INJEYAN, J. A., B. G. Sparkes, R. E. Falk, W. J. Peters, and G. B. Mills. 1988. «Interleukin-2 Secretion and Transmembrane Signalling in Burned Patients». Journal of Trauma, vol. 28, no. 2, p. 152-7.

TEODORCZYK-INJEYAN, J. A., B. G. Sparkes, G. B. Mills, R. E. Falk, and W. J. Peters. 1987. «Impaired Expression of Interleukin-2 Receptor (IL2R) in the Immunosuppressed Burned Patient: Reversal by Exogenous IL2». Journal of Trauma, vol. 27, no. 2, p. 180-7.

TEODORCZYK-INJEYAN, J. A., B. G. Sparkes, G. B. Mills, R. E. Falk, and W. J. Peters. 1989. «Increase of Serum Interleukin 2 Receptor Level in Thermally Injured Patients». Clinical Immunology & Immunopathology, vol. 51, no. 2, p. 205-15.

TEODORCZYK-INJEYAN, J. A., B. G. Sparkes, G. B. Mills, and W. J. Peters. 1991. «Immunosuppression Follows Systemic T Lymphocyte Activation in the Burn Patient». Clinical and Experimental of Immunology, vol. 85, no. 3, p. 515-8.

TEODORCZYK-INJEYAN, J. A., B. G. Sparkes, G. B. Mills, W. J. Peters, and R. E. Falk. 1986. «Impairment of T Cell Activation in Burn Patients: a Possible Mechanism of Thermal Injury-Induced Immunosuppression». Clinical and Experimental of Immunology, vol. 65, no. 3, p. 570-81.

THIERFELDER, W. E., J. M. van Deursen, K. Yamamoto, R. A. Tripp, S. R. Sarawar, R. T. Carson, M. Y. Sangster, D. A. Vignali, P. C. Doherty, G. C. Grosveld, and J. N. Ihle. 1996. «Requirement for Stat4 in Interleukin-12-Mediated Responses of Natural Killer and T Cells». Nature, vol. 382, no. 6587, p. 171-4.

TOPHAM, D. J., R. A. Tripp, and P. C. Doherty. 1997. «CD8+ T Cells Clear Influenza Virus by Perforin or Fas-Dependent Processes». Journal of Immunology, vol. 159, no. 11, p. 5197-200.

UCKER, D. S., J. D. Ashwell, and G. Nickas. 1989. «Activation-Driven T Cell Death. I. Requirements for De Novo Transcription and Translation and Association With Genome Fragmentation». Journal of Immunology, vol. 143, no. 11, p. 3461-9.

UTSUNOMIYA, T., M. Kobayashi, D. N. Herndon, R. B. Pollard, and F. Suzuki. 2001. «A Mechanism of Interleukin-12 Unresponsiveness Associated With Thermal Injury». Journal of Surgery Research, vol. 96, no. 2, p. 211-7.

VAN PARIJS, L., D. A. Peterson, and A. K. Abbas. 1998. «The Fas/Fas Ligand Pathway and Bcl-2 Regulate T Cell Responses to Model Self and Foreign Antigens». Immunity, vol. 8, no. 2, p. 265-74.

VASSEUR, F., A. Le Campion, J. H. Pavlovitch, and C. Penit. 1999. «Distribution of Cycling T Lymphocytes in Blood and Lymphoid Organs During Immune Responses». Journal of Immunology, vol. 162, no. 9, p. 5164-72.

VAUX, D. L., S. Cory, and J. M. Adams. 1988. «Bcl-2 Gene Promotes Haemopoietic Cell Survival and Cooperates With C- Myc to Immortalize Pre-B Cells». Nature, vol. 335, no. 6189, p. 440-2.

- VAUX, D. L., I. L. Weissman, and S. K. Kim. 1992. «Prevention of Programmed Cell Death in *Caenorhabditis Elegans* by Human Bcl-2». Science, vol. 258, no. 5090, p. 1955-7.
- VISHNEVSKAIA, S. M., I. u. M. Panova, and I. I. Kolker. 1987. «[T- and B Lymphocytes in Patients With Post-Burn Infections]». Khirurgiia (Mosk), no. 10, p. 33-9.
- WALLNER, S., R. Vautrin, J. Murphy, S. Anderson, and V. Peterson. 1984. «The Haematopoietic Response to Burning: Studies in an Animal Model». Burns Incl of Thermal Injury, vol. 10, no. 4, p. 236-51.
- WANG, J. M., J. D. Griffin, A. Rambaldi, Z. G. Chen, and A. Mantovani. 1988. «Induction of Monocyte Migration by Recombinant Macrophage Colony- Stimulating Factor». Journal of Immunology, vol. 141, no. 2, p. 575-9.
- WASSARMAN, D. A., M. Therrien, and G. M. Rubin. 1995. «The Ras Signaling Pathway in *Drosophila*». Current Opinion in Genetic Development, vol. 5, no. 1, p. 44-50.
- WATERHOUSE, P., L. E. Marengere, H. W. Mittrucker, and T. W. Mak. 1996. «CTLA-4, a Negative Regulator of T-Lymphocyte Activation». Immunology Reviews, vol. 153, p. 183-207.
- WENINGER, W., M. A. Crowley, N. Manjunath, and U. H. von Andrian. 2001. «Migratory Properties of Naive, Effector, and Memory CD8(+) T Cells». Journal of Experimental Medicine, vol. 194, no. 7, p. 953-66.
- WESSELBORG, S., O. Janssen, and D. Kabelitz. 1993. «Induction of Activation-Driven Death (Apoptosis) in Activated but Not Resting Peripheral Blood T Cells». Journal of Immunology, vol. 150, no. 10, p. 4338-45.
- WICK, M., E. Kollig, G. Muhr, and M. Koller. 2000. «The Potential Pattern of Circulating Lymphocytes TH1/TH2 Is Not Altered After Multiple Injuries». Archives of Surgery, vol. 135, no. 11, p. 1309-14.
- WILLIAMS, T. M., D. Moolten, J. Burlein, J. Romano, R. Bhaerman, A. Godillot, M. Mellon, F. J. Rauscher 3rd, and J. A. Kant. 1991. «Identification of a Zinc Finger Protein That Inhibits IL-2 Gene Expression». Science, vol. 254, no. 5039, p. 1791-4.
- WINCHURCH, R. A., J. N. Thupari, and A. M. Munster. 1987. «Endotoxemia in Burn Patients: Levels of Circulating Endotoxins Are Related to Burn Size». Surgery, vol. 102, no. 5, p. 808-12.
- WOLFE, R. R. 1981. «Review: Acute Versus Chronic Response to Burn Injury». Circ Shock, vol. 8, no. 1, p. 105-15.
- WOLFE, R. R., M. J. Durkot, J. R. Allsop, and J. F. Burke. 1979. «Glucose Metabolism in Severely Burned Patients». Metabolism, vol. 28, no. 10, p. 1031-9.
- WOOD, G. W., F. J. Volenec, M. M. Mani, and L. J. Humphrey. 1978. «Dynamics of T-Lymphocyte Subpopulations and T-Lymphocyte Function Following Thermal Injury». Clinical and Experimental of Immunology, vol. 31, no. 2, p. 291-7.
- WOOD, J. J., M. L. Rodrick, J. B. O'Mahony, S. B. Palder, I. Saporoschetz, P. D'Eon, and J. A. Mannick. 1984. «Inadequate Interleukin 2 Production. A Fundamental Immunological Deficiency in Patients With Major Burns». Annals of Surgery, vol. 200, no. 3, p. 311-20.

- WU, C. Y., K. Wang, J. F. McDyer, and R. A. Seder. 1998. «Prostaglandin E2 and Dexamethasone Inhibit IL-12 Receptor Expression and IL-12 Responsiveness». Journal of Immunology, vol. 161, no. 6, p. 2723-30.
- WYLLIE, A. H. 1980. «Glucocorticoid-Induced Thymocyte Apoptosis Is Associated With Endogenous Endonuclease Activation». Nature, vol. 284, no. 5756, p. 555-6.
- XIA, P. Y., J. Zheng, H. Zhou, W. D. Pan, X. J. Qin, and G. X. Xiao. 2002. «Relationship Between Lymphocyte Apoptosis and Endotoxin Translocation After Thermal Injury in Rats». World Journal of Gastroenterology, vol. 8, no. 3, p. 546-50.
- YAMADA, Y., S. Endo, and K. Inada. 1996. «Plasma Cytokine Levels in Patients With Severe Burn Injury--With Reference to the Relationship Between Infection and Prognosis». Burns, vol. 22, no. 8, p. 587-93.
- YAMADA, Y., S. Endo, K. Inada, H. Nakae, W. Nasu, S. Taniguchi, H. Ishikura, T. Tanaka, G. Wakabayashi, K. Taki, and S. Sato. 2000. «Tumor Necrosis Factor-Alpha and Tumor Necrosis Factor Receptor I, II Levels in Patients With Severe Burns». Burns, vol. 26, no. 3, p. 239-44.
- YAMAMOTO, H., S. Siltharm, S. deSerres, C. S. Hultman, and A. A. Meyer. 1996. «Effect of Cyclo-Oxygenase Inhibition on *in vitro* B-Cell Function After Burn Injury». Journal of Trauma, vol. 41, no. 4, p. 612-9; discussion 620-1.
- YASUDA, N., P. K. Lai, S. H. Ip, P. C. Kung, Y. Hinuma, M. Matsuoka, T. Hattori, K. Takatsuki, and D. T. Putilo. 1988. «Soluble Interleukin 2 Receptors in Sera of Japanese Patients With Adult T Cell Leukemia Mark Activity of Disease». Blood, vol. 71, no. 4, p. 1021-6.
- YU, X., S. Fournier, J. P. Allison, A. H. Sharpe, and R. J. Hodes. 2000. «The Role of B7 Costimulation in CD4/CD8 T Cell Homeostasis». Journal of Immunology, vol. 164, no. 7, p. 3543-53.
- YUAN, J. and H. R. Horvitz. 1992. «The *Caenorhabditis Elegans* Cell Death Gene *Ced-4* Encodes a Novel Protein and Is Expressed During the Period of Extensive Programmed Cell Death». Development, vol. 116, no. 2, p. 309-20.
- YUAN, J., S. Shaham, S. Ledoux, H. M. Ellis, and H. R. Horvitz. 1993. «The *C. Elegans* Cell Death Gene *Ced-3* Encodes a Protein Similar to Mammalian Interleukin-1 Beta-Converting Enzyme». Cell, vol. 75, no. 4, p. 641-52.
- ZEDLER, S., R. C. Bone, A. E. Baue, G. H. von Donnersmarck, and E. Faist. 1999. «T-Cell Reactivity and Its Predictive Role in Immunosuppression After Burns». Critical Care of Medicine, vol. 27, no. 1, p. 66-72.
- ZHENG, W. and R. A. Flavell. 1997. «The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells». Cell, vol. 89, no. 4, p. 587-96.
- ZHOU, D. H., A. M. Munster, and R. A. Winchurh. 1992. «Inhibitory Effects of Interleukin 6 on Immunity. Possible Implications in Burn Patients». Archives of Surgery, vol. 127, no. 1, p. 65-8; discussion 68-9.

