

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**ALTÉRATIONS FONCTIONNELLES DES CELLULES DENDRITIQUES
SUIVANT UNE BRÛLURE SÉVÈRE**

Par
Julie Patenaude

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

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Denis Girard
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Alexis Armour
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)
Hôtel-Dieu de Montréal
Centre des Grands-Brûlés

Examineur externe

Johanne Poudrier
Centre de recherche du CHUM
Université de Montréal

Directeur de recherche

Jacques Bernier
INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

Tout comme pour les chocs septiques, il a été observé chez les patients ayant subi des brûlures sévères, l'apparition du syndrome de la réponse inflammatoire systémique (SRIS) dans la phase précoce. Pendant cette réponse inflammatoire une fine balance existe entre les effets bénéfiques de l'inflammation et les effets secondaires pouvant conduire à des complications majeures pour l'organisme. L'aggravation du SRIS enclenche par la suite une réaction dite anti-inflammatoire compensatoire (CARS). L'émergence d'une réaction aggravée CARS représente le second facteur de risque dans l'apparition de septicémies, puisqu'une dépression immunitaire s'installe rendant l'organisme vulnérable aux infections nosocomiales. Ces déficits immunitaires sont d'origine multifactorielle dont une perturbation de l'activation de l'immunité acquise. Les cellules dendritiques (CDs) sont des cellules présentatrices d'antigènes qui jouent un rôle essentiel dans l'activation de l'immunité acquise et dans la coordination de la défense de l'hôte contre les pathogènes.

Notre objectif a été d'étudier l'impact du traumatisme sur les fonctions des CDs et élucider les mécanismes impliqués dans l'altération fonctionnelle de ces cellules. Plus spécifiquement, nous avons évalué les compétences des CDs lors de la phase CARS chez notre modèle murin de la brûlure sévère. Pour ce faire, nous avons stimulé les CDs en présence d'un ligand spécifique pour le TLR4 (lipopolysaccharides – LPS). Par la suite, nous avons élaboré un modèle d'étude *in vitro* des CDs à partir de précurseurs de la moelle osseuse différenciés en présence de Flt-3L. Cette différenciation permet l'obtention d'une population hétérogène de CDs que l'on nomme les FLDCs. À partir des FLDCs, nous avons induit un phénomène de tolérance aux LPS, phénomène s'apparentant à celui observée durant la période CARS. Ce modèle d'étude a permis de caractériser des mécanismes impliqués dans la tolérance aux LPS, dont l'expression d'une protéine inhibitrice de la voie de signalisation du TLR4 et l'implication des histones désacétylases (HDACs) dans la régulation de l'IL-12p40. Enfin, nous avons vérifié si des modulateurs de l'activité des HDACs pouvaient inhiber l'apparition de tolérance aux LPS en régénérant un phénotype dit basal de l'expression génique de la réponse

inflammatoire. Ainsi, l'utilisation de tels modulateurs présenteraient un potentiel thérapeutique pour des traumatismes, telles que les brûlures sévères, impliquant une mauvaise régulation de la réponse inflammatoire.

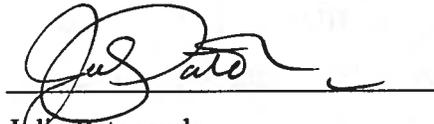
Le premier volet a démontré que les CD_s isolées au 10^e jour post-brûlure étaient défectueuses quant à leur rôle de cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Cette altération était caractérisée par une diminution de leur capacité à activer adéquatement les hybridomes de cellules T CD4⁺ BO97.11 suite à une stimulation via leur TLR4. Ces perturbations fonctionnelles s'accompagnaient d'une diminution de l'expression du TLR4, d'une perturbation de la voie d'activation des MAP kinases, d'une baisse de production d'IL-12p40 et d'une augmentation d'IL-10. Une sous-population de CD_s responsables de l'induction de la réponse de type Th1, soit les CD_s CD8 α^+ , étaient plus affectées par la brûlure sévère en comparaison avec les CD_s CD8 α^- . Nos résultats suggèrent que la brûlure sévère induit des changements fonctionnels chez les CD_s expliquant en partie l'inhibition de l'activation adéquate des lymphocytes T lors de la phase CARS. Cette reprogrammation des CD_s vers un phénotype de tolérance aurait un rôle à jouer dans l'apparition de la paralysie du système immunitaire lors d'infections secondaires et l'augmentation de l'incidence de septicémies post-brûlure.

Dans le deuxième volet de cette recherche, nous avons démontré que l'induction de la tolérance aux LPS chez les FLDCs, cause une diminution de la forme active de la p38 MAPK, de la SAPK/JNK, de l'expression du facteur de transcription NF- κ B (p65) et de la production de la cytokine immunostimulatrice Th1 (IL-12p40). Tout comme pour la brûlure sévère, ces perturbations de la voie de signalisation du TLR4 des FLDCs, devenues tolérantes à une stimulation aux LPS, étaient associées à une forte production d'IL-10. Notre étude a également démontré l'implication de la phosphatase MKP-1 dans l'apparition de tolérance aux LPS des FLDCs. Ainsi, nous suggérons que la tolérance aux LPS chez les FLDCs est associée à une suppression de la transduction du signal du TLR4 et à l'expression d'une protéine inhibitrice de cette cascade intracellulaire.

Dans le dernier volet, nous avons constaté que la tolérance aux LPS induit un changement de l'activité des HDACs chez les FLDCs. Nous avons noté chez les FLDCs tolérantes aux LPS une augmentation de l'activité HDAC totale en absence de changements au niveau de l'expression des HDACs (HDAC-1, -2, -3). L'obtention de ces résultats, nous a amené à étudier le rôle des HDACs par l'utilisation de modulateurs de ces enzymes. Dans un premier temps, nous avons utilisé un inhibiteur de HDACs de classe I et II (trichostatine A – TSA) lors de la seconde stimulation aux LPS. Nous avons noté une baisse significative de la production d'IL-12p40 chez les FLDCs du groupe témoin et du groupe de tolérance aux LPS. Puisque l'activité des HDACs semble être impliquée positivement dans la régulation de l'IL-12p40, nous avons donc opté pour l'utilisation de la théophylline, un activateur des HDACs de classe I. Nous avons démontré que l'utilisation de la théophylline, lors de la seconde stimulation aux LPS, a permis de rétablir la production d'IL-12p40 via une hausse de l'activation de la p38 MAPK chez les FLDCs tolérantes. Ces derniers résultats semblent démontrer que des altérations au niveau de l'activité des HDACs de la classe I seraient impliquées directement ou indirectement dans la régulation de l'IL-12p40 de CD. Les HDACs sont des phosphoprotéines qui peuvent être influencées par l'action des MAP kinases. Lors de l'induction de la tolérance aux LPS, une diminution de la forme phosphorylée des MAP kinases pourrait être responsable des perturbations des HDACs, qui à leur tour diminue la transcription du gène de l'IL-12p40 via un mécanisme encore inconnu.

Nous pouvons conclure que les CD jouent un rôle important dans l'apparition de l'état d'immunosuppression suivant une brûlure sévère. Nos résultats suggèrent que ces cellules, de part leurs perturbations fonctionnelles, ne peuvent répondre adéquatement à une stimulation via leur TLR4. Ces perturbations sont de l'ordre d'une diminution de l'activation de la cascade intracellulaire du TLR4 et de l'activité des HDACs de classe I. L'impact majeur de ces altérations est une baisse significative de la cytokine immunostimulatrice l'IL-12p40 et d'une hausse de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, pouvant induire une diminution de la réponse des cellules T. Il est toutefois possible de moduler les effets délétères de l'induction de tolérance chez les CD par l'utilisation d'un activateur de HDACs. La caractérisation des diverses modifications des CD lors d'une

brûlure sévère ou de la tolérance aux LPS permet une meilleure compréhension des mécanismes responsables de l'effondrement de la réponse immunitaire dans le but ultime de développer de nouvelles approches thérapeutiques.



Julie Patenaude

Étudiante



Dr. Jacques Bernier

Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

Statistiquement, nous allons rencontrer plusieurs centaines de personnes au cours d'une vie entière. Certaines ne seront que de passage et sans équivoque tandis que d'autres y laisseront une trace. Les personnes qui ont travaillé avec moi, tout au long de ces dernières années, sont de ces gens qui ont marqué ma vie professionnelle et personnelle. De part cette chance qui m'est allouée dans cette thèse, je tenais à remercier quelques-unes d'entre-elles.

Mon premier remerciement va à mon directeur de recherche Jacques Bernier, sans qui tout cela ne se serait réalisé. Merci de m'avoir enseigné l'art d'un scientifique. Tes conseils ont été des guides tout au long de mes études supérieures.

De plus, j'aimerais remercier mes collègues de laboratoire Michele D'Elia et Geneviève Dupéré-Minier. Merci Michele pour ta rigueur scientifique, tes connaissances multiples et ton amitié. Ce fut un réel plaisir d'échanger et de débattre nos idées scientifiques et autres. Merci aussi à Geneviève avec qui j'ai eu un plaisir immense à travailler. Tes multiples questions m'ont été fort utiles dans l'élaboration de mes expérimentations. Merci aussi à tous ceux qui ont travaillé à l'INRS, que ce soit les étudiants qui ont été de passage dans le laboratoire ou tous ceux qui ont fait de cet institut un endroit mémorable.

J'aimerais également remercier mon conjoint Patrice. Son soutien moral et affectif fût grandement apprécié au cours de cette aventure scientifique. Tu as cette grande qualité de relativiser et d'amoindrir les obstacles lorsque j'y faisais face. Merci également à ma famille. À mes parents, qui m'ont enseigné la persévérance, la minutie du travail et le respect. Votre amour et vos conseils m'ont été utiles au cours de ces études. Merci à mes frères Éric et Pierre-Luc, ainsi qu'à Valérie et Maïka pour votre présence et vos encouragements. Enfin, un dernier remerciement à mes amis et mes collègues de travail de Pharmascience pour votre support.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
TABLE DES MATIÈRES	x
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xv
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	6
1. LES BRÛLURES SÉVÈRES	8
1.1 BRÛLURE SÉVÈRE ET ALTÉRATIONS DE DIVERS SYSTÈMES.....	9
1.2 EFFETS DE LA BRÛLURE SÉVÈRE SUR L'IMMUNITÉ INNÉE.....	15
1.2.1 La brûlure sévère et les neutrophiles.....	15
1.2.2. La brûlure sévère et les macrophages	17
1.2.3 La brûlure sévère et les cellules NK	21
1.2.4 La brûlure sévère et les cellules T régulatrices	23
1.2.4.1 Les cellules NKT.....	23
1.2.4.2 Les cellules T $\gamma\delta$	23
1.3 EFFET DE LA BRÛLURE SÉVÈRE SUR L'IMMUNITÉ ACQUISE	25
1.3.1 La brûlure sévère et les cellules dendritiques.....	25
1.3.2 La brûlure sévère et les cellules T.....	29
1.3.2.1 Les cellules T CD4 ⁺ et CD8 ⁺	32
1.3.2.2 Les cellules T _{reg} CD4 ⁺ CD25 ⁺	36
1.4 La brûlure sévère et les cellules B.....	37
2. LES CELLULES DENDRITIQUES	39
2.1 DÉVELOPPEMENT DES CELLULES DENDRITIQUES	39
2.1.1 Les cellules dendritiques d'origine myéloïde	40
2.1.2 Les cellules dendritiques d'origine lymphoïde	41
2.2 SOUS-POPULATIONS DE CELLULES DENDRITIQUES.....	42
2.2.1 Les pré-cellules dendritiques.....	42
2.2.2 Les cellules dendritiques conventionnelles.....	44
i. Les cellules dendritiques migratoires	45
ii. Les cellules dendritiques résidentes	46
2.2.3 Les cellules dendritiques différenciées en présence de Flt-3L.....	47
2.2.4 Les cellules dendritiques inflammatoires.....	48
2.2.5 Les cellules dendritiques différenciées à l'aide de GM-CSF	49
2.3 PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES DES CELLULES DENDRITIQUES.....	50
2.3.1 Présentation des antigènes par les molécules de classe II du CMH.....	51
2.3.2 La maturation des cellules dendritiques	54
2.3.2.1 Les molécules de co-stimulation	55
a) La famille B7.....	56
b) La famille du TNF	56
c) Autres molécules de co-stimulation	57
2.4 RÔLE DES CELLULES DENDRITIQUES DANS LE SYSTÈME IMMUNITAIRE INNÉ.....	58
2.5 RÔLE DES CELLULES DENDRITIQUES DANS LE SYSTÈME IMMUNITAIRE ACQUIS.....	58
2.5.1 Les cellules dendritiques et les lymphocytes T CD4 ⁺	59
2.5.1.1 Initiation d'une réponse Th1	59
2.5.1.2 Initiation d'une réponse Th2.....	60
2.5.1.3 Initiation d'une réponse Th17.....	61

2.5.2 Les cellules dendritiques et les lymphocytes T CD8 ⁺	62
2.6 RÔLE DES CELLULES DENDRITIQUES DANS LA TOLÉRANCE AUX ENDOTOXINES.....	62
3. LES RÉCEPTEURS «TOLL-LIKE RECEPTOR»	65
3.1 STRUCTURE DU TOLL-LIKE RECEPTOR.....	65
3.2 LA FAMILLE DES RÉCEPTEURS TLRs	65
3.3 LE TLR4	67
3.3.1 LA CASCADE DE SIGNALISATION DU TLR4.....	68
3.3.1.1 Voie MyD88 dépendante.....	70
3.3.1.2 Voie MyD88-indépendante.....	71
a) Voie de TIRAP.....	71
b) Voie de TRIF	71
c) Voie de TRAM.....	72
3.4 LES FONCTIONS BIOLOGIQUES DES TLRs CHEZ LES CDS.....	72
3.5 RÉGULATION NÉGATIVE DES RÉCEPTEURS DE TYPE TLRs.....	75
3.6 LE TLR4 ET LES CHOCS SEPTIQUES.....	77
4. LES HISTONES DESACÉTYLASES.....	79
4.1 LES MODIFICATIONS ÉPIGÉNÉTIQUES	79
4.1.1 Le désacétylation des histones HDACs.....	81
4.1.1.1 HDACs de classe I	82
4.1.1.2 HDACs de classe II.....	84
4.1.1.3 HDACS de classe III.....	85
4.1.1.4 HDACS d'autre classe	85
4.2 LES MODULATEURS DE L'ACTIVITÉ DES HDACS	85
4.2.1 Les iHDACs et leur rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire	85
4.2.2 Les activateurs d'HDACs et leur rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire..	88
CHAPITRE 2 : OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE	91
CHAPITRE 3 : ARTICLE I	96
Mise en contexte.....	98
Résumé français	100
Contribution des auteurs.....	102
SELECTIVE EFFECT OF BURN INJURY ON SPLENIC CD11C ⁺ DENDRITIC CELLS AND CD8 α ⁺ CD4 ⁺ CD11C ⁺ DENDRITIC CELL SUBSETS.....	103
CHAPITRE 4 : ARTICLE II	149
Mise en contexte.....	151
Résumé français	152
Contribution des auteurs.....	154
LPS ACTIVATION OF FLT-3L DERIVED DENDRITIC CELLS UPON FIRST STIMULATION AND DURING ENDOTOXIN TOLERANCE	155
CHAPITRE 5 : ARTICLE III.....	199
Mise en contexte.....	200
Résumé français	202
Contribution des auteurs.....	204
THEOPHYLLINE RESTORES IL-12p40 PRODUCTION IN LPS TOLERANCE INDUCTION OF FLT-3L-DERIVED DENDRITIC CELLS	205
CHAPITRE 6 : DISCUSSION ET CONCLUSION	240
Perspectives	263
Conclusion.....	266

RÉFÉRENCES	269
ANNEXE	302

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Schématisation des réactions du système immunitaire suivant une brûlure sévère.	9
Figure 2 : Schématisation de la réponse de type Th1 versus la réponse de type Th2 lors de la phase SRIS et de la phase CARS post-brûlure.	31
Figure 3 : Schéma du développement des cellules dendritiques <i>in vivo</i>.	40
Figure 4 : Synapse immunologique entre une CD:cellule T.	53
Figure 5 : Rôle des TLRs dans l'activation des cellules dendritiques et dans l'immunité acquise.	55
Figure 6 : Famille des Toll-like receptors.	66
Figure 7 : Schéma de la voie de signalisation de TLRs MyD-88-dépendante et MyD88-indépendante.	69
Figure 8 : Remodelage de la chromatine par les enzymes HATS et HDACs.	80
Figure 9 : Schématisation de l'impact d'une brûlure sévère sur les CDs de la rate.	250
Figure 10 : Mécanismes impliqués dans l'induction de la tolérance aux LPS chez les FLDCs.	257
Figure 11 : Modèle d'action des HDACs dans la tolérance aux LPS.	262
Figure 12 : Pourcentage de cellules CD11c⁺/Microsphères-FITC dans la rate au 10^e jour suivant la brûlure sévère.	303
Figure 13 : Effet de la tolérance aux LPS sur les niveaux d'acétylation et de phosphorylation de l'histone H3 chez les FLDCs.	304
Tableau I : Agonistes des TLRs et sous-populations de CDs exprimant ces récepteurs.	67

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac	Anticorps
Ag	Antigène
aHDAC	Activateur d'HDAC
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	Protéine activatrice-1 (<i>activator protein-1</i>)
CARS	Réponse anti-inflammatoire compensatoire
cCD	Cellule dendritique conventionnelle
CCL12/MCP-5	Protéine chimiotactique des monocytes-5 (<i>monocyte chemoattractant protein-5</i>)
CCL19/MIP-3 β	Protéine inflammatoire des MAC-3beta (<i>MAC inflammatory protein-3beta</i>)
CCL2/MCP-1	Protéine chimiotactique des monocytes-1 (<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>)
CCL20/MIP-3 α	Protéine inflammatoire des MAC-3alpha (<i>MAC inflammatory protein-3alpha</i>)
CCL21/6Ckine	Chimiokine des tissus lymphoïdes secondaires (<i>secondary lymphoid tissue chemokine</i>)
CCL3/MIP-1 α	Protéine inflammatoire des MAC-1alpha (<i>MAC inflammatory protein-1alpha</i>)
CCL5/RANTES	Protéine régulée par activation, exprimée et sécrétée par les cellules T normales (<i>Regulated upon activation normal T expressed and secreted</i>)
CD	Classes de différenciation (<i>clusters of differentiation</i>)
CD25	Chaîne α du récepteur de l'IL-2 (IL-2R α)
CD	Cellule dendritique
CLP	Précurseur commun lymphoïde
CMH I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CMP	Précurseur commun myéloïde
ConA	Concanavalin A

COPD	Maladie pulmonaire obstructive chronique (<i>chronic obstructive pulmonary disease – COPD</i>)
COX-1	Cyclooxygénase -1
COX-2	Cyclooxygénase-2
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
CpG	Dinucléotides cytosine phospho guanine
CR	Récepteur à complément
CSF	Facteur de croissance hématopoïétique (<i>colony-stimulating factor</i>)
CTL	Réponse lymphocytaire T cytotoxique (<i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
CXCL1/KC	Chimiokine dérivée des kératinocytes (<i>keratinocyte-derived chemokine</i>)
CXCL10/IP-10	Protéine -10 inductible par l'interféron gamma (<i>gamma interferon induced protein-10</i>)
dCD	Cellule dendritique dermale
DD	Domaine de mort (<i>death domain</i>)
DTH	Réponse d'hypersensibilité de type retardée (<i>delayed-type hypersensitivity</i>)
ERK1/2	Kinase de régulation des signaux extracellulaires 1/2 (<i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>)
FLDC	Cellule dendritique différenciée avec Flt-3L
Flt3-L	Ligand de la tyrosine kinase semblable au FMS-3 (<i>FMS-like tyrosine kinase 3-ligand</i>)
GCR	Récepteur à glucocorticoïdes (<i>Glucocorticoid receptor</i>)
G-CSF	Facteur de croissance hématopoïétique des granulocytes (<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>)
GM-CSF	Facteur de croissance hématopoïétique des granulocytes et des MAC (<i>granulocyte/macrophage colony-stimulating factor</i>)
GMDC	Cellule dendritique différenciée avec GM-CSF
HAT	Histone Acétylase
HDAC	Histone Désacétylase
HMGB-1	<i>High mobility group box-1</i>
HSC	Cellule souche hématopoïétique (<i>hematopoietic stem cell</i>)
HSP	Protéine du choc thermique (<i>heat shock protein</i>)

iCa ²⁺	Calcium intracellulaire
iCD	Cellule dendritique inflammatoire
IFN	Interféron
IFN- γ	Interféron- γ
Ig	Immunoglobuline
iHDAC	Inhibiteur d'HDAC
IL	Interleukine
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
IPC	Cellule dendritique productrice IFN- γ de type 1
IRAK	Protéine kinase associée au récepteur à interleukine-1 (<i>interleukin receptor associated kinase</i>)
IRF	Facteur de régulation de l'INF (<i>INF regulatory factor</i>)
Jak	Janus kinase
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinase
kDa	Kilodalton
LBP	Protéines fixant des lipopolysaccharides (<i>LPS-binding protein</i>)
LES	Lupus érythémateux systémique
LPS	Lipopolysaccharides
MAC	Macrophage
Mal	Protéine adaptatrice semblable à MyD88 (<i>MyD88-adaptor like protein</i>)
MAPK	Protéine kinase activée par des agents mitogènes (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
M-CSF	Facteur de croissance hématopoïétique des MAC (<i>macrophage colony-stimulating factor</i>)
MKP-1	Phosphatase-1 des protéines kinases activées par des agents mitogènes (<i>mitogen-activated protein kinase phosphatase-1</i>)
MODS	Syndrome de lésions multiples des organes (<i>multiple organ dysfunction syndrome</i>)
NF- κ B	Facteur nucléaire kappaB (<i>nuclear factor kappaB</i>)
NK	Tueuse naturelle (<i>natural killer</i>)
NO	Oxyde nitrique
NOS	Oxyde nitrite synthétase

PAF	Facteur d'activation plaquettaire (<i>platelet-activating factor</i>)
PAMPs	Motifs moléculaires conservés des microorganismes (<i>pathogen. associated molecular pattern</i>)
pCD	Cellule dendritique plasmacytoïde
PCR	Protéine C-Réactive
PCT	Procalcitonine
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PHA	Phytohémaglutinine A
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PMA	Phorbol myristate acétate
Rag	Gene-2 activant la recombinaison
RNI	Réactifs intermédiaires de nitrogènes
SAHA	Acide hydroxamique suberoylanilide
SIGIRR	<i>Single ImmunoGlobulin Tol/IL1R-Related protein</i>
sMyD88	Forme courte de la molécule MyD88 (<i>short form of MyD88</i>)
SOCS	Protéines régulatrices de la transduction du signal des cytokines (<i>suppressors of cytokine signalling</i>)
SRIS	Syndrome de la réponse inflammatoire systémique
T _C	Cellule T cytotoxique
TcR	Récepteur antigénique des cellules T
TGF- β	Facteur de croissance transformant- β (<i>transforming growth factor-β</i>)
T _H	Lymphocyte T auxiliaire (<i>T helper</i>)
Th1	Lymphocyte T de type-1 (<i>T helper type-1</i>)
Th2	Lymphocyte T de type-2 (<i>T helper type-2</i>)
Théo	Théophylline
Tip CD	Cellule dendritique inflammatoire productrice de TNF- α et iNOS
TIR	Domaine Toll/IL-1R
Tirap	Protéine adaptatrice contenant un domaine Tir (<i>Tir-Domain containing adaptor protein</i>)

TLR	Récepteur semblable au récepteur Toll des drosophiles (<i>toll-like receptor</i>)
TNF-R1	Récepteur-1 du TNF
TNF- α	Facteur nécrosant- α (<i>tumor necrosis factor-α</i>)
TRAF2	Facteur-2 associé au récepteur du TNF (<i>TNF receptor-associated factor 2</i>)
TRAIL	Ligand associé au TNF induisant l'apoptose (<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>)
TRAM	Molécule adaptatrice reliée à TRIF (<i>TIRF-related adaptor molecule</i>)
T _{reg}	Cellule T régulatrice
TRIF	Protéine adaptatrice contenant un domaine TIR de l'INF β (<i>Tir-domain containing adaptor protein inducing INFβ</i>)
TSA	Trischostatine A

INTRODUCTION

Au cours de la dernière décennie, les recherches portant sur les traumatismes sévères et leur impact sur le système immunitaire ont permis d'élaborer un schéma des réactions survenant dans l'organisme. Tout comme pour les chocs septiques, il a été observé dans la phase initiale suivant une brûlure sévère, l'apparition du syndrome de la réponse inflammatoire systémique (SRIS). La réponse inflammatoire est une réponse physiologique normale, immédiate et transitoire aux signaux de danger émis lors de l'agression tissulaire. Il en résulte d'une production accrue de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α). Il est important de mentionner que l'origine cellulaire de cette production massive de cytokines pro-inflammatoires est encore à l'étude. Certaines études tentent de démontrer que les macrophages (MAC), les cellules dendritiques (CDs) et les neutrophiles seraient une des sources principales de cette production accrue de cytokines lors de la phase initiale. L'accumulation de ces cytokines au site de la brûlure, est responsable de leur augmentation au niveau systémique, modifiant ainsi plusieurs fonctions des cellules immunitaires. L'évolution non-contrôlée du SRIS enclenche par la suite une réaction dite anti-inflammatoire compensatoire (CARS) lors de la phase tardive. L'émergence de cette réaction CARS représente le second facteur de risque dans l'apparition de septicémies, puisqu'une dépression immunitaire s'installe rendant l'organisme vulnérable aux infections nosocomiales. Les principaux changements observés lors de cette phase, sont l'hyperactivation des MAC, une production de cytokines de type Th2 et l'apparition d'un état d'anergie des lymphocytes T. De part leur rôle dans l'initiation de la réponse des cellules T, les CDs seraient des acteurs de premier plan dans l'immunomodulation observée au niveau des cellules T suite au traumatisme. Jusqu'à présent, peu d'études ont caractérisé l'impact d'une brûlure sévère sur les compétences des CDs et du rôle qu'elles jouent dans l'effondrement de la réponse immunitaire lors de la phase CARS.

La dépression immunitaire post-brûlure peut être attribuable à une mauvaise reprogrammation des CDs, phénomène s'apparentant à celui de la tolérance aux endotoxines. La tolérance aux endotoxines est caractérisée par une production réduite des cytokines pro-inflammatoires et de cytokines immunostimulatrices des cellules T

associée à une hausse de cytokines anti-inflammatoires. Ce phénomène a surtout été étudié chez les monocytes/MAC stimulés de façon répétée en présence d'endotoxines (ex. : les lipopolysaccharides (LPS)). Chez les MAC, l'induction de tolérance aux LPS résulte d'une baisse d'activation de la voie des récepteurs *Toll-like receptors* (TLRs). Ainsi, diverses molécules inhibitrices de la voie des TLRs ont été identifiées chez les monocytes/MAC telles qu'IRAK-M, les protéines de la famille des protéines régulatrices de la transduction du signal des cytokines (SOCS), TOLLIP ou les phosphatases (MKP-1). Toutefois, les mécanismes qui engendrent un état de non-activation (tolérance) des CD sont peu connus.

De récentes études démontrent l'importance de la conformation de la chromatine et de son association aux histones dans la programmation cellulaire, la production de cytokines et la signalisation intracellulaire. Des modifications au niveau de l'acétylation et/ou la désacétylation des histones, que l'on nomme communément modifications épigénétiques, peuvent être à l'origine des perturbations observées chez les CD. L'acétylation (ajout d'un groupement acétyle) s'effectue sur les résidus lysine par des enzymes nommées histones acétyle transférases (HAT). Elle diminue l'interaction entre les queues des histones et le fragment d'ADN, ce qui entraîne le relâchement de la chromatine et permet ainsi une meilleure accessibilité aux gènes. L'acétylation est généralement associée à une activation de la transcription et est réversible grâce à l'action des histones désacétylases (HDACs). De part leur action, les HDACs sont associées à une répression de la transcription des gènes cibles. Toutefois, quelques études ont noté chez les MAC et les CD que certaines HDACs de la classe I avaient la capacité de moduler positivement la réponse inflammatoire via le recrutement de facteurs de transcription et de cofacteurs sur les gènes cibles. D'autres équipes de recherche ont également démontré un lien entre l'activité des HDACs et la régulation de la réponse inflammatoire via l'utilisation de modulateurs des HDACs. Certains inhibiteurs d'HDACs (iHDACs) possèdent un potentiel anti-inflammatoire. À l'opposé, l'activation des HDACs semble réguler la réaction inflammatoire via une augmentation de la sensibilité des cellules aux glucocorticoïdes. Les modifications épigénétiques sont également impliquées dans la suppression de la réponse inflammatoire lors de la tolérance aux endotoxines en rendant les gènes cibles « silencieux ». Ainsi, l'apparition de tolérance aux endotoxines pourrait être attribuable à l'apparition de protéines inhibitrices de la voie du TLR4, mais également

à l'induction de modifications épigénétiques des gènes cibles. Bien que les CD8 soient impliquées dans l'immunosuppression post-brûlure ou l'induction de tolérance aux endotoxines, les mécanismes sous-jacents sont encore incompris.

L'objectif de ce projet de recherche est de caractériser l'impact du traumatisme d'une brûlure sévère sur les compétences des CD8 et d'élucider certains mécanismes responsables des perturbations observées. Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'impact d'une brûlure sévère sur les propriétés fonctionnelles des CD8, plus précisément au niveau des sous-populations des CD8 CD8 α^+ et CD8 α^- présentes dans la rate. Puisque les CD8 présentes dans la rate sont peu nombreuses et difficiles à isoler, il devenait important d'élaborer un modèle d'étude *in vitro* représentant le plus exactement les fonctions biologiques des CD8 observées *in vivo*. Grâce aux CD8 différenciées à partir de précurseurs de la moelle osseuse en présence du ligand de la tyrosine kinase semblable au FMS-3 (Flt-3L), que l'on nomme les FLDCs, nous avons pu étudier les caractéristiques de la tolérance aux LPS. Cette technique de différenciation nous a permis d'obtenir une population hétérogène de CD8, s'apparentant à celle observée dans la rate. À partir des FLDCs, nous avons finalement étudié le rôle des modifications épigénétiques via l'action des HDACs dans l'induction de la tolérance aux LPS. De plus, l'utilisation de modulateurs de l'activité des HDACs chez les FLDCs devenus tolérants a permis d'énoncer une future approche thérapeutique peu invasive dans le rétablissement des fonctions des CD8 suivant le traumatisme de la brûlure sévère.

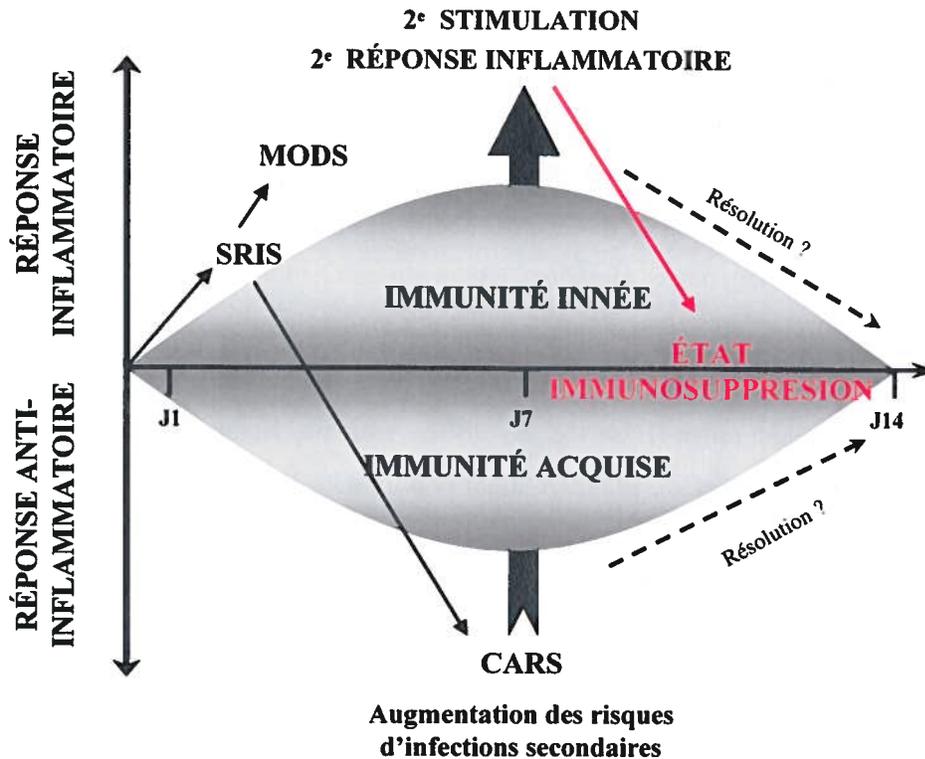
Cette thèse est divisée en plusieurs chapitres. Le premier chapitre est une revue des connaissances actuelles sur le traumatisme de la brûlure sévère, les CD8, le rôle du TLR4 dans l'activation des CD8 ainsi que sur le rôle des HDACs dans le processus inflammatoire. En premier lieu, les diverses études arborant l'impact des brûlures sévères sur les fonctions de l'immunité seront décrites. En second lieu, les fonctions spécifiques des sous-populations CD8 ainsi que leurs rôles dans l'immunité innée et acquise seront détaillés. Par la suite, le rôle du TLR4 dans l'activation des CD8 sera discuté. Enfin, un survol des HDACs et de leur implication dans la régulation de la réponse inflammatoire sera présenté. Le second chapitre décrira les objectifs spécifiques du projet de recherche. Les résultats obtenus seront présentés dans les

chapitres subséquents sous la forme de trois articles, dont je suis l'auteure principale. Ces articles se rapportent aux différents volets du projet. Chacun des articles est précédé d'une mise en contexte, d'une traduction française du résumé original et du détail de la contribution de chacun des auteurs de l'article. Finalement, l'ensemble de cet ouvrage sera synthétisé et analysé dans le dernier chapitre.

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES BRÛLURES SÉVÈRES

Les brûlures sévères représentent une des causes majeures de mortalité et de morbidité à travers le monde. Bien que le taux de mortalité ait diminué depuis les 50 dernières années, ce traumatisme est reconnu pour entraîner de multiples désordres systémiques. L'avancement des recherches a permis de changer le délai et les causes de mortalité chez les patients gravement brûlés. Auparavant, la période critique s'étalait de quelques heures à quelques jours suivant la brûlure sévère et les causes de mortalité étaient principalement l'infection au niveau de la plaie et une insuffisance respiratoire. Aujourd'hui, la majorité des patients gravement brûlés survivent à cette phase précoce mais l'apparition des phases SRIS/CARS accompagnées ou non d'un choc septique entraîne la mort de ces derniers. Les réactions qui surviennent suivant une brûlure sévère sont distinctes et connues (**Figure 1**). La première phase (phase précoce) survenant après une brûlure sévère se caractérise par une réaction exagérée de la réponse inflammatoire, communément appelée le Syndrome de la Réponse Inflammatoire Systémique (SRIS). À l'opposé de cette réponse, des mécanismes de contre-régulation sont mis en jeu et se retrouvent durant la phase tardive nommée la Réponse Anti-Inflammatoire Compensatoire (CARS). L'émergence de cette réaction CARS représente le second facteur de risque dans l'apparition de septicémies, puisqu'une dépression immunitaire s'installe rendant l'organisme vulnérable aux infections nosocomiales. Près de 80% des patients qui meurent des suites de la brûlure sévère est la résultante de complications et d'anomalies au niveau de diverses organes ou des systèmes (O'Sullivan et O'Connor, 1997).



(Figure adaptée de Lederer et al., 2004)

Figure 1 : Schématisation des réactions du système immunitaire suivant une brûlure sévère. Ce diagramme démontre les changements induits au niveau de l'immunité innée et acquise suivant ce traumatisme. Le syndrome du SRIS se développe quelques heures à quelques jours suivant la brûlure sévère. Il s'en suit de l'activation d'une réponse CARS chez les patients ayant survécu à la première phase. Cette 2^e phase est associée à une dépression du système immunitaire rendant ainsi les patients susceptibles aux infections secondaires ou nosocomiales. Suite aux infections secondaires, le système immunitaire inné peut enclencher une 2^e réponse SRIS qui est, dans la majorité des cas, associée au syndrome de lésions multiples des organes (MODS – *multiple organ dysfunction syndrome*).

1.1 BRÛLURE SÉVÈRE ET ALTÉRATIONS DE DIVERS SYSTÈMES

L'agression tissulaire causée par la brûlure crée une masse nécrotique importante et une rupture de la barrière cutanée. Elle engendre une réaction inflammatoire locale et initie la mise en place d'une première ligne de défense contre les pathogènes. Ainsi, les kératinocytes, les cellules endothéliales et les neutrophiles polynucléaires sont

attirés et activés aux sites de la brûlure (Sanchez, 2002). Sous l'action de facteurs d'agression, les kératinocytes enclenchent une réponse inflammatoire observée par une sécrétion de cytokines telles que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, le facteur nécrosant- α (TNF- α) et l'interféron (IFN). Cette libération de médiateurs inflammatoires a pour effet d'activer par paracrinie les cellules endothéliales et les fibroblastes du derme. L'activation des cellules endothéliales entraîne une augmentation de leur capacité adhésive via une sécrétion de molécules spécifiques (ICAM-1 et VCAM-1) qui a pour effet d'attirer les leucocytes circulants (Baumann et Gauldie, 1994; Ahmed, el-Shahat et Saad, 1999). Cette réponse inflammatoire est également associée à une libération massive de multiples composés : histamine (Friedl et al., 1989), kinines, métabolites de l'acide arachidonique (Harms et al., 1981; Arturson, Hamberg et Jonsson, 1973), radicaux libres (Saez et al., 1984; Demling et LaLonde, 1990), facteur d'activation des plaquettes (Ono et al., 1993), protéines de la cascade du complément, oxyde nitrique (NO) (Preiser et al., 1996; Carter et al., 1994), cytokines pro-inflammatoires (de Bandt et al., 1994a), etc. Ainsi, dans les minutes qui suivent une brûlure sévère, on assiste à une augmentation de médiateurs inflammatoires et de cellules, destinés à nettoyer les débris et à lutter contre d'éventuels agresseurs bactériens. Bien que cette réponse inflammatoire soit fortement utile pour la réparation des tissus, elle peut être la cause des complications majeures lorsqu'elle est suractivée et non contrôlée.

Outre une perte de la barrière cutanée, les brûlures sévères causent également des lésions respiratoires suite aux inhalations directes des fumées. La réaction inflammatoire après une brûlure avec inhalation de fumées est le processus physiopathologique le mieux exploré puisqu'il serait en partie à l'origine de l'apparition de septicémies post-trauma. La destruction du parenchyme pulmonaire par les fumées provoque l'activation des MAC et la libération d'agents chimiotactiques (Laffon et al., 1999; Laffon et al., 1999; Cox et al., 2001). De plus, un afflux de neutrophiles activés dans les poumons enclenche une cascade inflammatoire. La sécrétion de TNF- α par les neutrophiles est un médiateur important dans le syndrome de détresse respiratoire aiguë de l'adulte (SDRA) (Laffon et al., 1999). D'autres médiateurs comme l'IL-8 ou l'endothéline-1 (ET-1) participent localement à une réaction inflammatoire au niveau des alvéoles (Laffon et al., 1999;

Cox et al., 2001). Certaines cytokines, telles que l'IL-1 et l'IL-6, produites après destruction tissulaire périphérique au niveau des brûlures, vont atteindre l'appareil respiratoire par voie sanguine et amplifier l'inflammation pulmonaire existante. Les médiateurs de l'inflammation vont avoir deux effets principaux au niveau pulmonaire : une hyperperméabilité vasculaire pulmonaire et un effet vasoconstricteur (Soejima et al., 2001; Soejima et al., 2001; Nieman et al., 1995). Ces deux phénomènes conjugués vont être à l'origine d'un œdème pulmonaire diffus au niveau des bronches, du parenchyme et des alvéoles. Ainsi, les infections broncho-pulmonaires sont fréquentes chez les grands brûlés et plusieurs mécanismes expliquent cette complication. La perte de la muqueuse et de la clairance muco-ciliaire provoque un encombrement bronchique, une accumulation de sécrétions et de fibrine qui favorisent le développement bactérien. Le patient gravement brûlé sous ventilation mécanique présente les mêmes facteurs de risque de développer une pneumopathie que tout autre malade en réanimation : colonisation oro pharyngée, micro-inhalations gastriques et nutrition entérale continue, colonisation des circuits. Cette situation locale est aggravée par une immunodépression générale après une brûlure étendue.

Les brûlures sévères entraînent également une augmentation métabolique qui est proportionnelle à la surface brûlée (Wilmore et al., 1974). Le niveau métabolique augmente durant les 10 à 20 premiers jours pour ensuite diminuer progressivement (Hart et al., 2000). L'hypermétabolisme observé après la brûlure sévère est en partie médiée par une augmentation des cytokines pro-inflammatoires, tels que le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-8 et une hausse de l'activité oxydante (de Bandt et al., 1994b). Le métabolisme du glucose est également altéré suite au traumatisme de la brûlure (Wolfe, 1981). On assiste à une augmentation de la production de glucose engendrée 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 (Baumann et Gauldie, 1994). On remarque un trouble d'équilibre au niveau du rapport insuline/glucagon entraînant une hyperglycémie. La combinaison d'une hausse des hormones cataboliques, principalement le cortisol et les catécholamines, et d'une diminution de l'activité endogène des agents anaboliques (l'hormone de croissance et la testostérone)

contribue également à l'hypermétabolisme post-brûlure (D'Elia et al., 2005; Jeevanandam et al., 1992; Baumann et Gauldie, 1994). Cette réponse hormonale enclenche donc à un catabolisme protéique dans le but d'induire une libération massive de substrats énergétiques nécessaires (glucose, acides gras libres, acides aminés) pour combler l'énergie dépensée par la réaction inflammatoire. Ces processus sont le résultat d'un déséquilibre entre la vitesse de synthèse et de destruction protéique chez les grands brûlés d'où une perte importante de la masse protéique musculaire (Hart et al., 2000; Wilmore et Aulick, 1978). Comme toute forme d'induction de stress, la brûlure sévère induit aussi une augmentation de la lipolyse, processus résultant d'une dégradation excessive de la réserve des triglycérides en glycérol et en acides gras suivi d'une libération dans le sang (Wolfe et al., 1987). Ces 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. Ainsi, une diète faible en lipides (Jobin et al., 2000b) et riche en acides aminés (ex. : la glutamine) (Bernier et al., 1998) a démontré des effets bénéfiques sur le bon rétablissement des patients (Garrel et al., 2003; De Bandt et al., 1998; Wolfe et al., 1987).

De toutes les complications qui touchent les patients gravement brûlés, le risque d'infections est incontestablement le plus fréquent et le plus grave. Il est la conséquence de la destruction de la barrière cutanée et est donc d'autant plus fréquent et amplifié selon le pourcentage de la surface brûlée. L'apparition d'infections secondaires peut également être attribuable aux techniques de réanimation utilisées chez les grands brûlés. Ainsi, les infections liées à la mise en place de cathéters, de sondes urinaires ou de sondes d'alimentation représentent une cause importante d'infections nosocomiales chez les patients gravement brûlés (Merrer, 2005). Les agents infectieux les plus fréquemment observés dans les cultures de cathéters veineux sont le staphylococcus doré, le *Pseudomonas aeruginosa* et le *Candida albicans*, étant considéré ici comme la première source de contamination voire d'infection.

Le risque d'infections est également due à une hausse d'endotoxines circulantes d'origine intestinale causée par une translocation bactérienne du lumen du tractus gastro-intestinal vers d'autres organes (Cuevas et al., 1974; Deitch, Winterton et Berg, 1986; Deitch et Berg, 1987; Jobin et al., 2000b). La translocation bactérienne est généralement confirmée par la présence de bactéries dans les ganglions mésentériques provenant de la lumière intestinale. Cette translocation est la conséquence d'une augmentation de la perméabilité du mésentère au niveau du tractus gastro-intestinal suite au traumatisme de la brûlure sévère. Les mécanismes qui sont à l'origine de cette augmentation de la translocation bactérienne restent encore à être élucidés. Toutefois, diverses observations et conclusions ont été apportées au fil des années. La translocation bactérienne est associée à des altérations au niveau de la barrière muqueuse intestinale. Selon McCord et *al.*, une accumulation d'hypoxanthine et la conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase contribuent à la production de métabolites réactifs de l'oxygène (ROS) qui altèrent la membrane intestinale (McCord, 1985). De plus, les anomalies du système immunitaire au niveau du système digestif est également à l'origine de cette translocation bactérienne. Ainsi, une accumulation de neutrophiles activés accentuent la libération d'enzymes protéolytiques et d'ions superoxydes qui accentuent l'ischémie du mésentère (Brown et al., 1990). Les espèces réactives de l'oxygène sont capables d'oxyder des substances biologiques comme les protéines, les acides nucléiques et les acides gras insaturés des membranes lipidiques responsables du dysfonctionnement membranaire et de la désintégration cellulaire.

Une perturbation de l'immunité médiée par les cellules T est également observée dans la translocation bactérienne. Puisque les lymphocytes sont essentiels au bon fonctionnement de l'immunité acquise au niveau du tractus gastro-intestinal, une hausse de l'apoptose des cellules T CD4⁺ et des cellules T CD8⁺ dans les ganglions mésentériques pourrait être à l'origine des perturbations observées au niveau de la translocation bactérienne (Fazal et Al-Ghoul, 2007). Il a été noté qu'une déplétion en cellules T CD4⁺ et CD8⁺ ou en MAC augmente la translocation bactérienne de certaines bactéries comme *Escherichia coli* (Gautreaux, Deitch et Berg, 1994). Les mécanismes responsables de l'induction d'apoptose restent encore à être élucidés. Au

niveau des ganglions mésentériques, une activation inappropriée des cellules T CD4⁺ en présence de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) dites non-professionnelles (baisse des molécules de co-stimulation) peut engendrer une suppression de l'activation des cellules T (Fazal et Al-Ghoul, 2007; Ravindranath et al., 2001). Une stimulation in situ des cellules T CD4⁺, isolées de ganglions mésentériques, avec un anticorps (Ac) anti-Fas (anti-CD95) a démontré une hausse d'apoptose de ces cellules suivant la brûlure sévère. Ce traumatisme augmente donc l'apoptose des cellules T via le récepteur Fas (CD95), un récepteur de mort exprimé à la surface des cellules qui entraîne la mort cellulaire suivant sa liaison avec Fas ligand (Fukuzuka et al., 2000). De plus, il a été proposé que la présence de nombreux antigènes (Ags) ou d'activateurs polyclonaux (superantigènes), tel qu'observé au niveau du mésentère, pourrait être à l'origine de l'activation polyclonale induisant la mort cellulaire (*Activation-induced Cell Death - AICD*) des cellules T CD4⁺ (Unsinger et al., 2006). Quelque soit les mécanismes sous-jacents l'apoptose, ceci entraîne une ischémie mésentérique favorisant une hyperperméabilité intestinale et la translocation bactérienne. Les brûlures sévères induisent également l'activation de la cascade inflammatoire au niveau de l'intestin qui en résulte à une augmentation de cytokines inflammatoires (IL-1 β , TNF- α , etc.) et de médiateurs (prostaglandines E₂ – PGE₂) (Choudhry et al., 2001). Cette hausse a pour effet d'augmenter le recrutement de leucocytes au niveau du tractus gastro-intestinal, qui à leur tour synthétiseront et libèreront des médiateurs de la cascade inflammatoire et endommageront la barrière intestinale (Tokyay et al., 1993; Barlow, 1994). Il a été observé une amélioration de l'imperméabilité intestinale après une inhibition de la p38 protéine kinase activée par mitogènes (MAPK - *mitogen activated protein kinase*) (Gan, Pasricha et Chen, 2007). Cette inhibition de la p38 MAPK a induit une diminution d'IL-1 β , de NO et de cyclooxygénase-2 (COX-2) au niveau du tractus gastro-intestinal. L'activation soutenue de la réponse inflammatoire est donc en partie responsable de la translocation bactérienne. Bien que les mécanismes soient encore à l'étude, il est clair que cette augmentation systémique d'endotoxines joue un rôle dans l'initiation du SRIS et l'apparition de chocs septiques suivant une brûlure sévère.

La gravité des chocs septiques s'explique également par la progression de la réponse SRIS qui enclenche l'apparition d'une réponse CARS afin de contrer les effets néfastes de l'inflammation. Cet état CARS se définit comme un état de reprogrammation du système immunitaire où il a été observé une hausse de cytokines anti-inflammatoires et une dépression du système immunitaire (Murphy et al., 2004). Un changement de la réponse de type Th1 (*T helper type-1*), caractérisée par la production de TNF- α et d'IFN- γ , vers une réponse de type Th2 (*T helper type-2*), où l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 sont sécrétées, est aussi un facteur distinctif de la phase CARS. Ainsi, les brûlures sévères et la dépression immunitaire sont étroitement liées et engendrent l'apparition d'infections généralisées, les septicémies. Divers groupes de recherche ont étudié le phénomène des brûlures et l'apparition d'infections. Une étude, portant sur 5882 patients gravement brûlés, a démontré que plus de 1481 des 1529 patients décédés avaient des cultures de sang dites positives (Mason, McManus et Pruitt, 1986). Ces cultures étaient identifiées positives lorsqu'il y avait détection de bactéries provenant (1) d'organismes entériques, (2) du genre *Pseudomonas*, (3) de bactéries Gram-négative ou (4) d'organismes d'apparence aux levures. Ainsi, la caractérisation et la compréhension des mécanismes responsables de cette dépression immunitaire est essentielle afin de développer une approche thérapeutique future qui diminuerait le taux de morbidité et de mortalité attribuable aux brûlures sévères.

1.2 EFFETS DE LA BRÛLURE SÉVÈRE SUR L'IMMUNITÉ INNÉE

Lors d'une brûlure grave, on assiste à une altération de l'ensemble des fonctions du système immunitaire, c'est-à-dire celles de l'immunité innée et de l'immunité acquise. Tel que mentionné précédemment, une augmentation d'endotoxines circulantes a pour effet de recruter et d'activer un vaste nombre de cellules de l'immunité innée tels que les neutrophiles, les MAC, les cellules NK et les cellules T régulatrices innées.

1.2.1 La brûlure sévère et les neutrophiles

Les neutrophiles sont des granulocytes polynucléaires possédant une activité phagocytaire et oxydative ainsi qu'un potentiel protéolytique. Ces cellules sont parmi

les premiers effecteurs de l'immunité innée à être interpellés après une brûlure sévère. Essentiellement, toutes interactions entre les neutrophiles et leur environnement se feront par l'entremise de récepteurs de surface. Cette forme de communication permet aux neutrophiles d'être recrutés de façon spécifique aux sites d'inflammation et de modifier leur réponse à des stimuli. Le chimiotactisme des neutrophiles est en partie lié à l'activation de la cascade du complément avec la formation locale du composé C5a. Suivant une brûlure sévère, une activation de la voie alterne du complément causée par la libération de LPS aux sites d'inflammation a été observée (de Boer et al., 1992). Cette activation se résume par la production accrue de médiateurs tels que les composés C4a, C3a et le C5a (Haeney, 1998; Moore et al., 1986; Friedl et al., 1989). Contrairement à l'effet bénéfique de petites quantités du composé C5a sur le recrutement de neutrophiles, il a été démontré que des quantités excessives induisent plutôt une dépression de l'activité des cellules. Exposés à des concentrations élevées de C5a, les neutrophiles expriment en moins grande quantité le récepteur de surface spécifique pour ce composé, d'où une diminution de chimiotactisme durant la période post-brûlure. Cependant, Moore et ses collaborateurs ont démontré que les neutrophiles expriment minimalement le récepteur C5a permettant ainsi une migration basale de ces cellules aux sites d'inflammation suivant la brûlure (Moore et al., 1986). Ces découvertes portant sur la migration et le recrutement des neutrophiles portent à croire que les interactions entre le C5a et les neutrophiles ont lieu lors d'une phase vasculaire, quelques heures suivant la brûlure. Cette phase est responsable de l'activation et de l'attachement des neutrophiles aux cellules de l'endothélium, dans un but subséquent de reconnaître des protéines du tissu conjonctif et de phagocyter des pathogènes (Till et al., 1989; Charo et al., 1986; Till et al., 1989). L'activation des neutrophiles par ces peptides physiologiques, tel que le C5a, induit aussi une augmentation de l'expression de certains récepteurs dont le FMLP (récepteur fMet-Leu-Phe), les récepteurs à complément CR1 et CR3, (récepteur pour phagocytose) et les récepteurs de la famille des intégrines (CD11b/CD18) (Solomkin, 1990). L'augmentation de l'expression du CR3 joue un rôle important au niveau du recrutement et de l'activation des neutrophiles puisque cette molécule est impliquée dans l'adhérence des cellules polymorphonuclées à l'endothélium (Moore et al., 1986).

Dans la phase précoce suivant une brûlure sévère, les neutrophiles activés sont reconnus comme étant une source principale de ROS. La présence de ce médiateur provoque des dommages importants au niveau de la peau, des poumons, du foie et des intestins (Cetinkale et al., 1999). Cette hyperactivation des neutrophiles est également associée à une inhibition de l'apoptose chez ces derniers. Vingt-quatre heures suivant un choc septique, il a été observé une diminution significative de l'apoptose des neutrophiles présents dans les poumons (Parsey et al., 1999). Jimenez et ses collaborateurs en ont conclut que le retard d'apoptose observé chez les neutrophiles amplifie la phase SRIS et l'apparition de perturbation au niveau de divers organes (Jimenez et al., 1997). Par contre, durant la phase tardive, c'est-à-dire plusieurs jours voir quelques mois suivant une brûlure sévère, la capacité des neutrophiles à produire des ROS semble être fortement atténuée (Parment et al., 2007). Ainsi, l'état d'immunosuppression observée entre le 7^e et 14^e jour post-brûlure résulte en partie d'une inhibition des fonctions effectrices des neutrophiles.

1.2.2. La brûlure sévère et les macrophages

Les MAC sont également des effecteurs de l'immunité innée et possèdent des fonctions multiples pouvant moduler les mécanismes d'une réponse immunitaire. Lors du traumatisme de la brûlure, l'équipe de Santangelo et ses collaborateurs ont observé une augmentation de monocytes/MAC drainant la plaie et en périphérie (Santangelo, Gamelli et Shankar, 2001). L'expansion de monocytes durant la période post-brûlure est due en partie à une élévation plasmatique du facteur de croissance hématopoïétique des MAC (M-CSF - *macrophage colony-stimulating factor*), et de l'expression du récepteur au facteur M-CSF. Outre une augmentation du facteur de croissance, une hausse des précurseurs monocytaires, dont le précurseur monocytaire précoce ER-MP12 et le précurseur monocytaire tardif ER-MP20, favoriserait l'expansion de MAC post-brûlure (Santangelo, Gamelli et Shankar, 2001). Une augmentation des précurseurs ER-MP20, ayant un phénotype F4/80⁺Gr-1⁺, a été notée dans les 48 premières heures suivant la brûlure sévère (Muthu et al., 2008). Durant cette période, une hausse de la différenciation des précurseurs ER-MP20 en MAC a été démontrée. Toutefois, cette différenciation des précurseurs ER-MP-20 en MAC est diminuée à partir du 4^e jour post-brûlure, lorsque comparée au groupe témoin

(Muthu et al., 2008). Bien qu'il y ait une augmentation accrue de MAC durant la phase précoce suivant la brûlure, la réponse de ces derniers est altérée due à une désensibilisation de ces cellules face aux signaux inhibiteurs. Le traumatisme de la brûlure induit donc une hyperactivation des MAC qui joue un rôle néfaste dans l'initiation de la réponse immunitaire acquise. La libération de divers stimuli, tels que les pathogènes circulants, les protéines du choc thermique (HSP - *heat shock protein*), les composantes de la cascade de la coagulation (fibronectine A, fibrinogène) suivant une brûlure sévère sont tous des activateurs potentiels pour les MAC (Murphy et al., 2004). L'activation soutenue de ces MAC a été démontré par une augmentation excessive de cytokines pro-inflammatoires produites, telles que le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6, et l'IL-8 lorsque stimulés *ex vivo* (Schwacha, 2003). Les deux premières sont fortement augmentées dans la circulation pour une courte période suivant la brûlure (phase précoce) (Vindenes, Ulvestad et Bjerknes, 1998a). Il a été démontré que les niveaux élevés de TNF- α produits par les MAC corrélerent avec l'établissement d'un choc septique suite à une brûlure sévère (Noel et al., 2007). L'IL-1 est une cytokine pléiotropique qui régule la réponse inflammatoire en favorisant le chimiotactisme ainsi que la maturation et l'activation des granulocytes, des cellules B et T (Dinarello et al., 1986). Par contre, la production d'IL-6 et d'IL-8 demeure à des niveaux élevés pour une plus longue période après le traumatisme et corréle avec une augmentation de l'incidence de mortalité post-brûlure (de Bandt et al., 1994b; Guo et al., 2003). Une des fonctions principales de l'IL-6 est d'induire la sécrétion des protéines de la phase aiguë synthétisées par le foie et la différenciation et la prolifération des lymphocytes B (Sherwood et Toliver-Kinsky, 2004). Toutefois, une persistance des hauts taux d'IL-6 corréle majoritairement avec une détérioration de l'état de santé des patients et l'apparition de chocs septiques suivant un traumatisme (Sherwood et Toliver-Kinsky, 2004). D'ailleurs, une amélioration de la réponse d'hypersensibilité de type retardé (DTH - *delayed-type hypersensitivity*) a été observée chez les souris brûlées ayant reçu un traitement d'anticorps (Ac) anti-IL-6 (Fontanilla et al., 2000). De plus, une libération accrue d'IL-6 par les MAC (Rincon et al., 1997) et/ou les CDs (Dodge et al., 2003) favorise une réponse de type Th2 chez les cellules T CD4⁺ observée par une augmentation d'IL-4 et une diminution de la réponse de type Th1. Quant à l'IL-8, cette cytokine contribue à l'activation soutenue des neutrophiles au niveau des poumons et du foie chez les patients gravement brûlés (Laffon et al., 1999).

Les MAC activés sécrètent également le facteur de croissance transformant- β (TGF- β), qui dans des conditions physiologiques normales, est impliqué dans le chimiotactisme des monocytes, des neutrophiles, des fibroblastes et joue un rôle dans la réparation tissulaire. Cependant, 6 à 8 jours suivant une brûlure sévère les niveaux plasmatiques de TGF- β demeurent élevés. Il a été démontré que ces niveaux de TGF- β sont en partie responsables de la suppression de la prolifération des cellules B et de l'induction d'apoptose des splénocytes (de Bandt et al., 1994b; Schwacha, 2003; Guo et al., 2003). Plusieurs études ont observé une corrélation entre l'apparition de l'état d'immunosuppression post-brûlure et la présence de concentrations élevées de TGF- β . Schwacha et Somers ont démontré, à l'aide d'un modèle murin de brûlure sévère, une augmentation de l'activité de la forme inductible de l'oxyde nitrite synthétase (iNOS) chez les MAC (Schwacha et Somers, 1998). Cette hausse de l'activité de NOS induit une suppression de la prolifération des cellules T en période post-trauma. La présence de NO induit une activité cytotoxique chez les cellules cibles via l'inhibition de l'activité réductase des ribonucléotides, de l'activation mitochondriale et par l'induction d'apoptose (Schwacha et Chaudry, 2002).

Un autre aspect immunologique important suivant une brûlure sévère, est l'augmentation de PGE₂ produit par les MAC (Schwacha, 2003; O'Sullivan et O'Connor, 1997). La présence de cytokines, telles que l'IL-1, IL-6 et le TNF- α , favorise l'expression de COX-2 et la production de PGE₂ des MAC et des fibroblastes (Hahn et Gamelli, 2000). Les PGE₂ sont synthétisés à partir de l'acide arachidonique par l'enzyme COX-1, exprimé de façon constitutive, et de l'enzyme inductible COX-2. Outre la suppression de la prolifération des cellules T, les PGE₂ peuvent également moduler les fonctions effectrices des MAC. En présence de PGE₂, l'expression et l'activité iNOS des MAC stimulés aux LPS sont inhibées (Marotta, Sautebin et Di Rosa, 1992). Cependant, il a été observé suite au traumatisme d'une brûlure sévère une inhibition de l'effet suppresseur des PGE₂ sur l'activité iNOS des MAC (Schwacha et al., 1998). Ainsi, les MAC isolés de souris brûlées libèrent en plus grandes quantités des réactifs intermédiaires de nitrogène (RNI). La sécrétion de PGE₂ induit aussi une inhibition de la réponse de type Th1 puisqu'elle supprime la

production d'IL-12 des MAC en période post-trauma (Schwacha et al., 2002).

Suivant une brûlure sévère ou lors d'un choc septique, les MAC produisent également de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire (Lyons et al., 1997a; Friedman et al., 1997). La cytokine IL-10 a la capacité de supprimer l'expression d'iNOS (Cunha, Moncada et Liew, 1992), de COX-2 et la production d'IL-6 et de TNF- α chez les MAC (Schwacha, 2003). Cependant, suite à une brûlure, Schwacha et ses collègues ont constaté que les MAC étaient résistants à l'effet suppressif de l'IL-10 augmentant ainsi leur niveau d'activation (Schwacha et al., 2001). Cette diminution à répondre à l'IL-10 est en partie due à une baisse de l'expression du récepteur à l'IL-10 et à une hausse de l'expression de CD11b à la surface des MAC. Suite à une brûlure sévère, les MAC sont donc suractivés puisqu'ils sont réfractaires à l'effet supprimeur des PGE₂ et de l'IL-10.

L'état d'hyper activation des MAC en période post-brûlure est également attribuable à une altération de la voie de signalisation intracellulaire. Il a été noté que l'augmentation des niveaux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) altère l'activité des iNOS et la production de TNF- α et d'IL-6 chez les MAC (Schwacha et al., 1998). Plusieurs messagés intracellulaires, comme les kinases dépendantes de l'AMPc (PKA), les niveaux intracellulaires de calcium (iCa^{2+}) et la protéine kinase C (PKC), sont directement régulés par l'AMPc. Des études ont démontré que l'activité soutenue iNOS et la production élevée de TNF- α et d'IL-6 sont dépendantes de la voie PKC chez les MAC isolés post-brûlure (Tremblay et al., 1995; Renz et al., 1988). Des perturbations au niveau de l'activation de facteurs de transcription (NF- κ B, AP-1, CREB) sont aussi impliquées dans l'hyperactivation des MAC suite au traumatisme sévère ou lors d'un choc septique (Abraham, 1996). L'activation des MAP kinases joue un rôle dans l'hyperactivation des MAC. Au 7^e jour post-brûlure, des MAC isolés de la rate et stimulés avec du LPS présentent des perturbations au niveau de l'activation des MAP kinases (Alexander et al., 2004). Ainsi, l'augmentation de PGE₂, de TNF- α , d'IL-1 β , d'IL-6 et d'IL-10 des MAC splénique corrént avec une forte activation de la p38 MAPK et d'une suppression de la JNK/SAPK MAPK.

Aucun changement n'a été observé quant à l'activation de l'ERK1/2 MAPK chez les MAC stimulés aux LPS. Lederer et ses collaborateurs ont également noté au 1^{er} et 7^e jour post-brûlure, une forte activation de la p38 MAPK chez les MAC stimulés aux LPS (Maung et al., 2005). Cette forte activation de la p38 MAPK est associée à une forte production de TNF- α et à une augmentation de l'expression de l'ARNm du récepteur « toll-like receptor-4 » (TLR4). Ainsi, ces études démontrent que les brûlures sévères et/ou les chocs septiques induisent une hyperactivation des MAC, d'où une hausse de production de cytokines et de médiateurs immunosuppresseurs. Cet état d'hyperactivation des MAC jouent également un rôle dans l'inhibition de la réponse des cellules T. Lors de la phase CARS post-brûlure, les MAC sont impliqués dans l'établissement de la réponse de type Th2 versus une réponse de type Th1, via leur capacité à produire des PGE₂ et de l'IL-10 (Schwacha, 2003). Les niveaux élevés de PGE₂ et de RNI produits par les MAC suppriment également l'activation des cellules T post-brûlure (Schwacha, 2003). Toutefois, une étude antérieure faite dans notre laboratoire a démontré que la suppression de l'activation des cellules T n'était pas uniquement dépendante de la présence des MAC (Patenaude et al., 2005).

1.2.3 La brûlure sévère et les cellules NK

Les « cellules tueuses naturelles » NK (NK – *natural killer*) sont des lymphocytes granuleux de grande taille faisant partie du système immunitaire inné. Les cellules NK sont impliquées dans la reconnaissance des cellules anormales (ex : infectées par des virus ou cellules cancéreuses) qui en association avec l'IL-2 ou suite à la liaison d'anticorps avec les récepteurs Fc, vont éliminer ces cellules infectées par cytolyse. Les infections secondaires sont un des problèmes majeurs auquel doivent faire face les patients gravement brûlés qui ont survécu à la phase initiale. C'est pourquoi plusieurs équipes de recherche ont étudié l'impact d'une brûlure sévère sur les fonctions des cellules NK. Malgré qu'il y a augmentation du nombre de cellules NK suivant la brûlure sévère, l'activité de ces dernières est fortement perturbée (Stein et al., 1984; Klimpel et al., 1986). Cette dépression de l'activité des cellules NK a même été observée jusqu'à 20 jours post-brûlure. La diminution des niveaux d'IL-2 en période post-trauma est une des causes principales des altérations fonctionnelles des cellules NK (Klumpel, Herndon et Stein, 1988; Mendez et al., 1993). Bender et ses

collaborateurs ont également démontré que les niveaux élevés d'endotoxines suivant une brûlure sévère pouvaient être à l'origine de ces perturbations (Bender et al., 1988). Il est important de préciser que plus de 70% des bactéries qui se retrouvent dans la circulation sanguine chez les grands brûlés s'accumulent au niveau du foie et peuvent ainsi, affecter les cellules NK. Ainsi, il a été observé au niveau des cellules NK du foie une sécrétion élevée d'IFN- γ (Ami et al., 2002). Toutefois, en réponse à une seconde stimulation en présence de LPS ou lors d'infections secondaires, ces dernières produisent beaucoup moins d'IFN- γ . Cette inhibition de la production d'IFN- γ chez les cellules NK s'observe plus particulièrement entre le 7^e et le 14^e jour post-brûlure. Des études portant sur l'utilisation de cytokines ou de facteurs de croissance chez le modèle murin de brûlure sévère, ont permis de comprendre le rôle des cellules NK dans l'immunomodulation suivant une brûlure sévère.

Il a été démontré que la production d'IFN- γ augmentait lorsque les cellules NK étaient mises en présence d'IL-18 suivant une brûlure sévère (Ami et al., 2002). L'IL-18 est une cytokine produite principalement par les MAC et les cellules Kupffer et semble avoir un effet bénéfique sur les cellules NK. De plus, l'utilisation de la cytokine ligand de la tyrosine kinase semblable au FMS-3 (Flt-3L - *Fms-like tyrosine Kinase 3-ligand*), un facteur de croissance hématopoïétique, a également démontré son potentiel bénéfique sur les fonctions des cellules NK suivant une brûlure sévère (Toliver-Kinsky et al., 2003). Le Flt-3L est un facteur de croissance hématopoïétique capable d'entraîner l'expansion et la différenciation des cellules dendritiques myéloïdes et lymphoïdes *in vivo* chez la souris et l'homme à partir de précurseurs de la moelle osseuse (Maraskovsky et al., 1996). Il a été noté chez les souris brûlées ayant reçu des injections de Flt-3L, une augmentation du nombre de cellules NK au niveau de la rate ainsi qu'un rétablissement au niveau de leur capacité à produire de l'IFN- γ suivant leur activation (Toliver-Kinsky et al., 2003). En conclusion, les perturbations observées chez les cellules NK jouent un rôle dans l'inhibition de la réponse de type Th1 après une brûlure sévère.

1.2.4 La brûlure sévère et les cellules T régulatrices

Les cellules régulatrices T (T_{reg}) sont un groupe de cellules lymphocytaires T impliquées dans le contrôle des réactions auto-immunes. Ces cellules T_{reg} ont la capacité de réguler l'activité des cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$, des cellules B et des MAC. Cette catégorie de cellules T se divise en 2 groupes que l'on appelle les cellules T_{reg} participantes «de l'immunité innée» et les cellules T_{reg} participantes «de l'immunité acquise» selon leurs caractéristiques cellulaires et leurs mécanismes d'action. Les cellules $T\gamma\delta$ et les cellules NKT font partie des cellules T_{reg} «de l'immunité innée» et sont également impliquées dans l'immunomodulation suivant la brûlure sévère (Venet et al., 2008).

1.2.4.1 Les cellules NKT

Les lymphocytes natural killer T (NKT) sont un groupe hétérogène de lymphocytes T. Ils possèdent des marqueurs de cellules T (TCR $\alpha\beta$ et le CD3) et de cellules NK (NK1.1, Ly49C, AsGM1 et la chaîne d'IL-2R β). La plupart de ces cellules reconnaissent la molécule non-polymorphique CD1d, une molécule analogue aux protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I), qui est une molécule présentatrice des antigènes lipidiques et glycolipidiques. Les NKT constituent environ 0,2% des lymphocytes T du sang périphérique et sont reconnues comme une source importante d'IFN- γ , cytokine essentielle dans l'activation précoce de l'activité antibactérienne des MAC (Nieuwenhuis et al., 2002). Cependant, suite au traumatisme de la brûlure sévère, les cellules NKT augmentent leur capacité à produire de l'IL-4 et diminuent leur synthèse d'IFN- γ (Faunce et al., 2003). Elles participent donc à la polarisation d'une réponse de type Th1 vers une réponse de type Th2 durant la période post-brûlure.

1.2.4.2 Les cellules $T\gamma\delta$

Les cellules $\gamma\delta$ T représentent une population de cellules T ayant un TCR particulier. La plupart des cellules T possèdent un TCR composé de deux glycoprotéines, les

chaines α and β (Carding et Egan, 2002). Cependant, les cellules T $\gamma\delta$ possèdent un TCR fait d'une chaîne γ et d'une chaîne δ . Ces lymphocytes sont moins abondants (ils représentent 5% du total des lymphocytes) que les cellules T $\alpha\beta$, mais se retrouvent en plus grande quantité dans la muqueuse de certains organes, tels que la peau, les intestins et le tractus urino-génital. Tout comme les cellules NKT, les cellules T $\gamma\delta$ reconnaissent les antigènes par la molécule CD1d et peuvent être activées en présence de LPS, de motifs moléculaires conservés des microorganismes (PAMPs), de TNF- α ou de superantigènes (Haas, Pereira et Tonegawa, 1993). Elles aident à la surveillance immunitaire, à la régulation de la réparation de tissus, au contrôle de l'inflammation, à la réponse immunitaire anti-infectieuse et contre les cellules cancéreuses. Suite à leur activation, elles produisent de l'IFN- γ et du TNF- α et possèdent une activité cytotoxique (voie des perforines/granzymes).

Bien qu'il y ait des divergences quant à l'impact de la brûlure sévère sur le nombre de cellules T $\gamma\delta$, tous s'entendent pour dire que ce traumatisme induit une activation de ces cellules. L'expression de marqueurs d'activation tel que le CD69 et le HLA-DR, est fortement augmentée chez les cellules T $\gamma\delta$ périphériques lors de la phase SRIS (Enoh et al., 2007) (Matsushima et al., 2004). Il a été démontré que les lymphocytes $\gamma\delta$ stimulent les MAC à synthétiser du TNF- α favorisant l'établissement du SRIS (Nishimura et al., 1995; Schwacha, Ayala et Chaudry, 2000). Chez des souris déficientes pour le récepteur $\gamma\delta$, aucune augmentation de la production de TNF- α , de CMP-1 et d'IL-6 n'a été observée suivant la brûlure sévère (Daniel et al., 2007; Wu et al., 2004). Cependant, il a été démontré que la présence de cellules T $\gamma\delta$ contribue à augmenter les chances de survie, puisque des études faites avec des souris TcR $\delta^{-/-}$ ont démontré un haut taux de mortalité suivant une brûlure sévère (Schwacha, Ayala et Chaudry, 2000). Il a été observé que les lymphocytes T $\gamma\delta$ intraépithéliales favorisent la production de chimiokines nécessaires au recrutement des cellules immunitaires (ex. MAC) lors d'une lésion (Boismenu et al., 1996). Ces cellules T $\gamma\delta$ participent aussi au recrutement précoce (3 heures post-brûlure) de neutrophiles au niveau de la plaie par une production massive de chimiokines, telles que le CCL4 (MIP-1 β - *MAC inflammatory protein-1beta*) et le CXCL1 (KC - *keratinocyte-derived chemokine*) (Toth et al., 2004). Ces cellules sont également impliquées dans le recrutement de

neutrophiles au niveau des poumons et du petit intestin, par la production de chimiokines spécifiques chez le modèle murin de la brûlure sévère (Toth et al., 2004). Ces études suggèrent donc que le traumatisme de la brûlure active les cellules T $\gamma\delta$ qui par la suite participent à l'initiation de la réponse inflammatoire et au recrutement de cellules au niveau de la plaie.

1.3 EFFET DE LA BRÛLURE SÉVÈRE SUR L'IMMUNITÉ ACQUISE

L'immunité adaptative est également impliquée dans le développement du SRIS et de l'établissement du CARS suivant la brûlure sévère. Pratiquement toutes les fonctions des lymphocytes T sont atteintes chez les brûlés graves. Ainsi, l'activation des cellules T CD4⁺/CD8⁺ lors de la phase SRIS favorise la production massive de cytokines de type Th1 qui s'en suit de l'établissement progressif d'une réponse de type Th2 et d'un état d'anergie des cellules lors de la phase CARS. Le traumatisme de la brûlure influence également les proportions de cellules T naïves versus cellules T effectrices/mémoires présentes dans les organes lymphoïdes. Ces changements peuvent être dus à l'effet direct de la brûlure sur les cellules cibles mais peuvent aussi découler de perturbations majeures des cellules activatrices des lymphocytes T, soit les cellules dendritiques. Nul doute que ces altérations affectent également l'activation des cellules B et la production d'anticorps suivant la brûlure sévère.

1.3.1 La brûlure sévère et les cellules dendritiques

Les CD_s sont des cellules sentinelles essentielles dans l'initiation de la réponse immunitaire acquise et innée (fonctions qui seront discutées ultérieurement). Par leur capacité à reconnaître divers pathogènes via des récepteurs spécifiques, dont les récepteurs de type Toll (TLR - *Toll-like receptor*) (voir section 3 – Les récepteurs « Toll-like receptor »), elles capturent les antigènes puis sécrètent des cytokines inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1, l'IL-12 et autres. La combinaison de la signalisation passant par les récepteurs TLRs et de la production de cytokines activent les CD_s, ce qui entraîne la maturation de ces dernières. Ces CD_s matures se transforment en CPA capables de stimuler les cellules T. Elles jouent donc un rôle

critique tant dans l'élaboration d'une réponse adéquate par les lymphocytes T, que dans le maintien de la tolérance immunitaire. C'est vers les années 80 que sont apparues les premières études évaluant l'impact d'une brûlure sévère sur les cellules Langerhans, une sous-population de CD^s présentes dans l'épiderme. À cette époque l'identification de cellules de Langerhans se faisait par l'analyse de l'expression de molécules spécifiques telles que de l'antigène de différenciation T6 (CD1), la molécule Ia et l'antigène de différenciation des monocytes/MAC MyD4 et Mo1. L'équipe de Gothelf et ses collaborateurs a observé une corrélation entre le nombre de cellules de Langerhans T6⁺, présentes dans la population de cellules mononucléaires de sang périphérique, et la brûlure sévère (Gothelf et al., 1988). Ils en concluent donc que quelques jours suivant la brûlure, il y a recrutement des cellules de Langerhans de la moelle osseuse vers la plaie par un mécanisme inexpliqué. L'utilisation de souris irradiées soumises à une brûlure a permis de démontrer que l'augmentation de cellules de Langerhans au niveau de la plaie pouvait également être la résultante d'une augmentation de la différenciation de cellules précurseurs présentes dans la circulation (Ghaznawie, Papadimitriou et Heenan, 1999). Nonobstant le mécanisme responsable de l'augmentation de cellules de Langerhans circulantes, il a été observé que ces dernières jouent un rôle dans la prolifération des cellules épithéliales et dermales au niveau de la plaie (Singer et Clark, 1999). Une équipe de recherche a récemment étudié l'impact d'une brûlure sévère sur les populations de CD^s dites myéloïdes (mCD^s) et plasmacytoïdes (pCD^s) présentes dans le sang périphérique de patients brûlés (D'Arpa et al., 2009). Ces deux sous-populations de CD^s ont été identifiées par l'utilisation de marqueurs spécifiques, soit le CD11c et le CD123. Les mCD^s CD11c⁺/CD123⁻ ont une capacité supérieure à stimuler les cellules T en comparaison aux pCD^s CD11c⁻/CD123⁺, qui lorsque activées sécrètent de grandes quantités d'IFN- γ (Banchereau et al., 2000). Dans le sang périphérique, il a été observé une diminution des mCD^s et des pCD^s circulantes dans les vingt-quatre premières heures suivant la brûlure. La comparaison des patients brûlés non septiques versus les patients brûlés développant un choc septique post-trauma a permis de démontrer une corrélation entre une diminution plus soutenue des mCD^s et pCD^s et l'apparition de sepsis. Les pourcentages de CD^s circulantes étaient inférieurs chez les patients septiques en comparaison avec les patients non septiques et les sujets sains et ce, pendant les 14 jours suivant la brûlure. Une baisse des cellules précurseurs des CD^s (D'Arpa et al., 2009) ou une augmentation de l'apoptose chez les CD^s (Hotchkiss et

al., 2002) pourrait en partie expliquer la diminution soutenue de CD4 chez les patients brûlés développant un choc septique. À l'opposé, une augmentation du pourcentage de mCD4 et pCD4 a été notée entre le 2^e et le 10^e jour suivant la brûlure chez les patients non septiques (D'Arpa et al., 2009). Tout comme pour l'équipe de Gothelf, cette étude démontre qu'il y a recrutement de CD4 vers le sang périphérique en réponse aux divers pathogènes libérés par le site brûlé. Une augmentation de CD4 a également été observée dans les ganglions drainant la plaie 24 à 72h suivant la brûlure (Kataranovski et al., 2000). Néanmoins, aucune de ces études n'a pas permis de comprendre le rôle des CD4 dans l'immunomodulation post-brûlure. Cette hausse de CD4 pourrait à la fois jouer un rôle positif dans l'initiation d'une réponse immunitaire via l'activation des lymphocytes T ou bien initier une anergie des cellules T via l'induction de tolérance suivant le traumatisme.

Certains groupes de recherche ont tenté d'élucider le rôle des CD4 dans les deux phases distinctes de la brûlure sévère, soit la phase SRIS et la phase CARS. L'équipe de Lederer a démontré *ex vivo* que le traumatisme de la brûlure sévère affectait la réponse inflammatoire des CD4 via une activation du récepteur TLR4 (Paterson et al., 2003). Les récepteurs TLRs sont exprimés à la surface de diverses cellules et permettent l'activation de ces dernières lorsqu'il y a reconnaissance et liaison de ligands spécifiques (voir section 3 – Les récepteurs « Toll-like receptor »). Une stimulation des splénocytes, dépourvus de cellules T, avec des ligands spécifiques pour le TLR4 et le TLR2 (LPS, le lipide A et des peptidoglycanes) induit une hausse de la production d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF- α chez les souris brûlées en comparaison avec le groupe témoin (Paterson et al., 2003). À partir de splénocytes totaux, l'utilisation du marqueur spécifique pour les CD4, le CD11c⁺, a permis d'identifier que ces dernières participaient à la production massive de cytokines pro-inflammatoires 7 jours post-trauma. Des médiateurs endogènes, tels que les oligosaccharides de l'acide hyaluronique présents dans la matrice extracellulaire, les fragments de fibronectine cellulaire ainsi que les protéines HSP et les médiateurs libérés (*high mobility group box-1* - HMGB1) par les cellules nécrotiques, ont la capacité d'activer les TLRs des CD4 et d'amplifier leur production de cytokines. Lederer et al. ont émis l'hypothèse que le développement du SRIS serait en partie

initié par une forte activation de la voie des TLRs chez les MAC et les CDs. Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'augmentation excessive de cytokines pro-inflammatoires au 7^e jour post-trauma était fortement atténuée chez des souris déficientes pour le TLR4 (Paterson et al., 2003). Une étude récente dirigée par l'équipe de Lederer a démontré que la brûlure sévère affectait les sous-populations de CDs présentes dans la rate (Fujimi et al., 2009). L'utilisation de marqueurs spécifiques, tels que le CD4 (pour mCDs), le B220 (pour les pCDs) et le CD8 (pour les CDs dites lymphoïdes), a permis de démontrer une diminution significative de ces trois sous-populations 24 heures et 7 jours suivant la brûlure. Une stimulation du TLR4 chez les CDs, isolées de la rate au 7^e jour post-brûlure, a induit une augmentation du récepteur PD-L1, récepteur se liant au récepteur PD-1 sur les lymphocytes et inhibant leur activation. Cette hausse du récepteur PD-1 était accompagnée d'une production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et TNF- α). De plus, la capacité d'activation des CDs ne semblaient pas être altérée par la brûlure et ce, 24 heures et 7 jours post-trauma (Fujimi et al., 2009). Aucun changement significatif au niveau de la production de cytokines, telles que l'IL-2, l'INF- γ , l'IL-10 et l'IL-13, n'a été noté chez les cellules T CD4⁺ stimulées en présence de CDs spléniques de souris brûlées. Ainsi, cette dernière étude tente de démontrer que les CDs jouent un rôle dans l'initiation de la réponse SRIS, par la production de cytokines inflammatoires, sans toutefois participer à l'apparition de la phase CARS et à l'induction d'une réponse Th2. Toutefois, il aurait été souhaitable d'observer l'impact de la brûlure sévère sur les CDs au-delà de 7 jours puisque l'établissement de la phase CARS s'étale du 7^e au 14^e jour post-trauma. En somme, l'ensemble de ces études démontrent que les CDs sont affectées directement par la brûlure sévère et qu'elles jouent un rôle dans l'immunomodulation post-trauma.

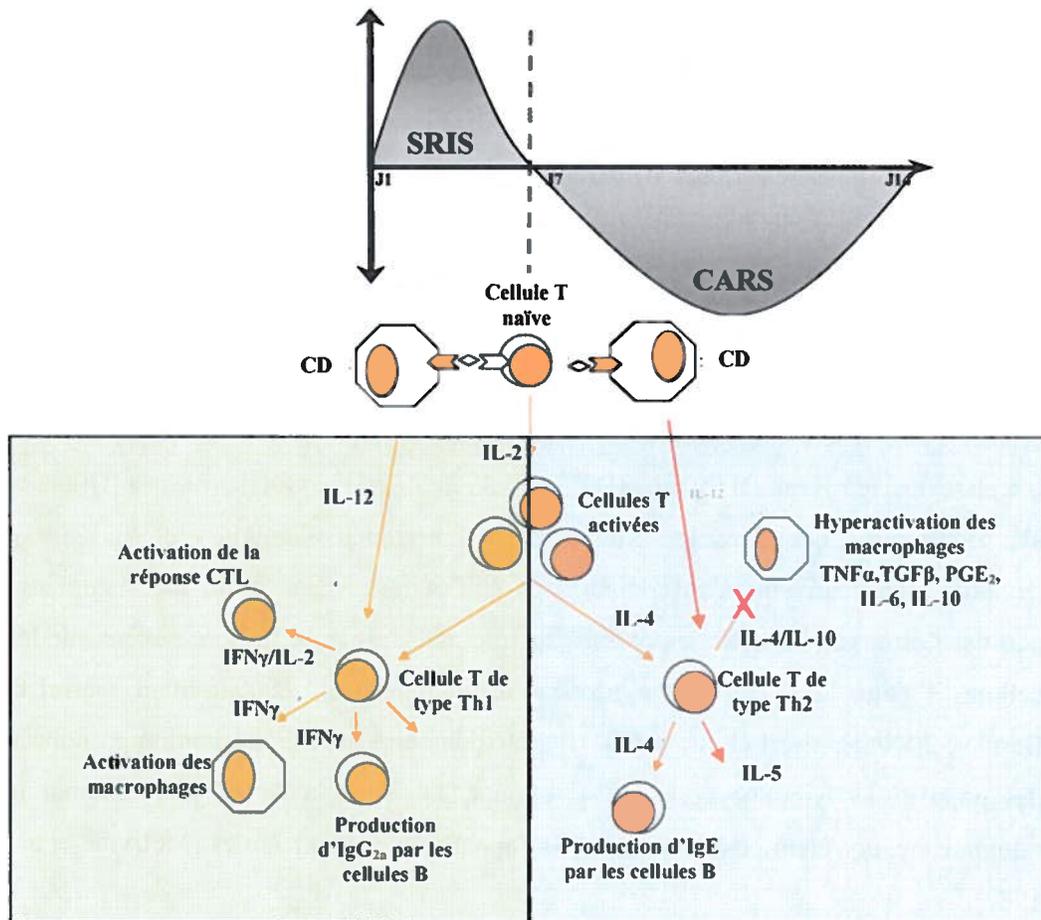
Bien que peu d'études aient caractérisé l'effet d'une brûlure sévère sur les fonctions de CDs lors de la phase CARS, l'équipe de Sherwood a clairement démontré la nécessité d'avoir des CDs dites professionnelles dans le bon maintien de la réponse immunitaire (Toliver-Kinsky et al., 2005; Toliver-Kinsky et al., 2003). La phase CARS est une réponse compensatoire face à un stress de nature bactérien et/ou de nature pro-inflammatoire visant à contrecarrer les effets néfastes des médiateurs pro-

inflammatoires. L'on note parmi les médiateurs anti-inflammatoires l'IL-4, l'IL-10, le TGF- β , le PGE₂ et autres. La réponse CARS a surtout été étudiée en observant l'impact de la brûlure sévère sur l'induction d'une réponse de Th2 chez les lymphocytes T. Cette dernière sera discutée ultérieurement. Ainsi, les CD^s jouent un rôle important dans l'orientation de la réponse des cellules T CD4⁺ vers un profil Th1 ou Th2. L'équipe de Sherwood a donc injecté quotidiennement pendant 5 à 10 jours du Flt-3L chez des souris soumises à une brûlure sévère. Tel que mentionné précédemment, le Flt-3L est un facteur de croissance hématopoïétique capable d'entraîner l'expansion et la différenciation des cellules dendritiques myéloïdes et lymphoïdes *in vivo* chez la souris et l'homme à partir de précurseurs de la moelle osseuse (Maraskovsky et al., 1996). Ils ont démontré que suivant l'administration de cette cytokine Flt-3L, il y a une augmentation significative du nombre de CD^s dans la rate et une hausse des niveaux d'IL-12 et d'IL-15, deux cytokines dites immunostimulatrices (Toliver-Kinsky et al., 2003). Ainsi, l'expansion des CD^s permet de rétablir l'activation d'une réponse de type Th1 dans la phase tardive de la brûlure sévère (10 jours), qui est principalement associée à une production massive de cytokines de type Th2 (IL-4 et IL-10). Sherwood et ses collaborateurs ont également démontré que l'administration de Flt-3L augmente le taux de survie chez les souris brûlées infectées avec *P. aeruginosa* (Toliver-Kinsky et al., 2005). Cette augmentation du taux de survie est associée à une hausse du nombre de CD^s, une diminution de l'infection et de la dissémination bactérienne au niveau des organes, telle que la rate, les poumons, le cœur et le foie. Donc, les CD^s jouent un rôle dans l'initiation de la réponse SRIS et semblerait être négativement affectée par l'apparition de la phase CARS post-brûlure.

1.3.2 La brûlure sévère et les cellules T

L'état d'immunosuppression observé chez les grands brûlés a souvent été associé à un mauvais fonctionnement et/ou à diverses altérations des lymphocytes T. Il a été observé que la stimulation *in vivo* des cellules Th1 après la brûlure était responsable de la mort des animaux traumatisés (Kavanagh et al., 1998; Kell et al., 1999). L'effet létal a été associé à une augmentation systémique d'IL-2, d'IFN- γ et de TNF- α . De plus, une augmentation plasmatique d'INF- γ et d'IL-12p70 a été notée 24 à 48 heures

suisant une brûlure sévère chez la souris (Finnerty et al., 2009). Paradoxalement, la forte augmentation des hormones de stress tels que les glucocorticoïdes, semble être responsable de la diminution du nombre de lymphocytes T au niveau du thymus et de la rate d'animaux ayant subi une brûlure sévère (D'Elia et al., 2005). L'effet de la brûlure sur les cellules T est donc bi phasique. Nous avons également démontré une augmentation des cellules T naïves et effectrices/mémoires au jour 1 suivant la brûlure (Patenaude et al., 2005). Cette augmentation significative est suivie d'une diminution de 50% du nombre de cellules T. Chez les cellules restantes, l'effet majeur observé au cours du SRIS est une modification dans le profil de cytokines synthétisées, favorisant graduellement l'apparition d'une réponse de type Th2 (O'Sullivan et al., 1995), tel qu'illustré à la **figure 2**. Le développement du SRIS est donc lié à l'élimination non sélective des lymphocytes T et à l'établissement progressif d'une réponse de type Th2, qui s'intensifie lors de la réponse CARS.



(Figure adaptée de Lederer et al., 2004 et de Sherwood and Toliver-Kinsky, 2004)

Figure 2 : Schématisation de la réponse de type Th1 versus la réponse de type Th2 lors de la phase SRIS et de la phase CARS post-brûlure. Peu d'études ont observé une hausse de la réponse de type Th1 durant la phase précoce d'une brûlure sévère. Une augmentation des concentrations plasmatiques des cytokines IFN- γ et de l'IL-12 favorise une réponse de type Th1 lors du SRIS. Une activation des MAC et des cellules T CD8⁺ (réponse cytotoxique « CTL ») ainsi qu'une production d'Ac IgG_{2a} par les lymphocytes B ont également été observés lors de la phase SRIS. La majorité des études portent sur la phase tardive (CARS) post-brûlure, durant laquelle un changement du profil de la réponse Th1 vers une réponse de type Th2 a été noté. Une hausse plasmatique de l'IL-2R et de la production des cytokines IL-4, IL-5 et IL-10 ont pour effet d'inhiber la production d'INF- γ et d'IL-2, favorisant une réponse de type Th2. La sécrétion soutenue d'IL-6, d'IL-10, de TNF- α , de TGF- β et de PGE₂ par les MAC hyperactivés favorise également une réponse de type Th2. Une diminution de la production d'IL-12 par les CD perturbe également la production d'INF- γ et d'IL-2 par les cellules T activées, et donc diminue la réponse Th1. Ainsi, plusieurs cellules et médiateurs jouent un rôle spécifique dans l'établissement de la réponse Th2 lors de la phase CARS post-brûlure.

1.3.2.1 Les cellules T CD4⁺ et CD8⁺

Le traumatisme d'une brûlure sévère engendre des perturbations autant chez les cellules T CD4⁺ que chez les cellules T CD8⁺. Des études ont démontré une diminution du ratio de cellules T auxiliaires (T_H-CD4⁺)/ cellules T cytotoxiques (T_C-CD8⁺), suggérant une baisse du nombre de cellules CD4⁺ et d'une augmentation de cellules CD8⁺ (O'Mahony et al., 1985; Organ et al., 1989). Chez le modèle murin de la brûlure sévère, Organ et ses collaborateurs ont noté une baisse du nombre total de lymphocytes dans la rate et les ganglions drainant la plaie dans les 6 jours suivant la brûlure suivi d'une augmentation (Organ et al., 1989). De plus, le nombre de lymphocytes au niveau du thymus (D'Elia et al., 2005), de la moelle osseuse (Organ et al., 1989) ainsi que dans les ganglions mésentériques (Choudhry et al., 2002), demeure significativement inférieur. Des études faites dans notre laboratoire ont permis d'observer un effet suppressif du traumatisme de la brûlure sévère sur les cellules T entre le 7^e et 14^e jour post-brûlure (Jobin et al., 2000a; Jobin, Garrel et Bernier, 2000; Banwell et al., 1998). Il a été démontré qu'une diminution prononcée des populations lymphocytaires CD4⁺ et/ou CD8⁺ au delà de 14 jours suivant le traumatisme, corrélient positivement avec l'apparition de septicémies (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 le pourcentage de cellules T naïves (CD45RO+) versus cellules T mémoires (CD45RO-) a démontré une augmentation du nombre de cellules T CD4⁺ naïves et CD4⁺ T mémoires dans les ganglions drainant la plaie en fonction du temps post-brûlure (Lawrence, de Riesthal et Calvano, 1996). Une de nos études antérieures a également démontré que la brûlure induit des changements dans la répartition et l'activation des cellules T naïves versus mémoires (Patenaude et al., 2005). Ainsi, nous avons noté une diminution significative du pourcentage de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ naïves (CD62L^{high}-CD44^{low}) dans la rate au 10^e jour post-trauma. Bien que l'expression de CD69, marqueur

d'activation des cellules T, augmentent considérablement chez les cellules T naïves au 10^e jour, nous avons observé une forte activation de l'apoptose chez ces dernières en comparaison avec les cellules T mémoires. Deitch et ses collaborateurs avait émis l'hypothèse que l'effet d'une brûlure sévère sur les fonctions lymphocytaires varierait selon les compartiments étudiés, d'où la variété d'interprétations des résultats (Deitch, Xu et Qi, 1990). 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 mésentérique ou encore au niveau des plaques de Payer's, les résultats obtenus divergent sans toutefois être contradictoires.

En plus d'affecter le nombre et la distribution des lymphocytes T, le traumatisme par brûlure affecte directement les capacités de prolifération des lymphocytes T. Plusieurs études ont démontré qu'après une stimulation avec des agents mitogéniques, telle que la concanavaleine A (Con A) ou la phytohémagglutinine (PHA), la prolifération *in vitro* des cellules T périphériques était inhibée au 14^e jour (O'Mahony et al., 1985) (Deitch, Xu et Qi, 1990; Schluter et al., 1991). Cette incapacité à répondre à des stimuli mitogéniques est d'origine multifactorielle et joue un rôle important dans l'état d'immunosuppression des grands brûlés. Une des causes principales de cette diminution de prolifération s'explique par une baisse de production d'IL-2, cytokine essentielle à la prolifération et à l'activation des lymphocytes T (Teodorczyk-Injeyan et al., 1986). Cette baisse d'IL-2 est attribuable à une diminution l'expression de *c-fos*, qui en association avec *c-Jun* permet la transcription du gène (Horgan et al., 1994). En absence de c-Fos, la protéine c-Jun se lie à la région du promoteur mais aucune transcription du gène de l'IL-2 n'a lieu, d'où une baisse de la prolifération lymphocytaire. Il a été aussi démontré une anomalie entre l'activation de la PKC et la transcription de *c-fos*, conduisant ainsi à une inhibition de la production d'IL-2 (O'Riordain et al., 1993). L'équipe de O'Suilleabhain a aussi noté diverses altérations au niveau du recrutement du facteur de transcription NF-κB et de la liaison de la protéine AP-1 au gène de l'IL-2 chez les cellules T CD4⁺ isolées 9 jours suivant le traumatisme (O'Suilleabhain et al., 2001). Plusieurs équipes de recherche ont établi que les brûlure sévères perturbent la prolifération des lymphocytes T en inhibant l'expression du récepteur à l'IL-2 (IL-2R) (Jobin, Garrel et Bernier, 2000;

Teodorczyk-Injeyan et al., 1986; Horgan et al., 1994; O'Riordain et al., 1993) (Wood et al., 1984). Cette diminution d'IL-2R est la résultante d'une diminution de synthèse d'IL-2 puisque cette cytokine est essentielle à la génération et/ou à la maintenance de l'expression de son récepteur (Teodorczyk-Injeyan et al., 1987). Donc, les modifications observées au niveau de la transcription du gène de l'IL-2, de la sécrétion de l'IL-2 et de l'expression du IL-2R peuvent jouer un rôle dans la polarisation des cytokines de type Th1 vers un type Th2 ainsi que dans l'établissement d'un état d'anergie des cellules T suite au traumatisme.

La suppression de la prolifération *in vitro* des lymphocytes T, provenant d'animaux ayant eu une brûlure sévère, a aussi été démontré comme étant dépendante des MAC. En effet, l'élimination des MAC de la population cellulaire avait pour effet de rétablir la prolifération des lymphocytes à des niveaux comparables au groupe contrôle (De et al., 1997). La production de PGE₂ et de TGFβ par les monocytes/MAC a été identifiée parmi les facteurs pouvant induire une paralysie fonctionnelle des lymphocytes T (O'Sullivan et O'Connor, 1997). Les niveaux élevés de PGE₂ induisent une hausse de l'activation de l'adénylate cyclase générant des concentrations importantes d'AMP_c intracellulaire ayant pour effet de diminuer la synthèse d'IL-2 des cellules T (Schwacha et al., 1999). Les cellules T de patients gravement brûlés sont plus sensibles à la présence d'AMP_c causant une mauvaise activation de la phospholipase C et de PKC (Schwacha et al., 1999). Il a également été démontré que la libération des PGE₂ lors d'un choc septique inhibe l'activation de la protéine tyrosine p59^{lck}, protéine essentielle à la prolifération des cellules T et la sécrétion d'IL-2 (Choudhry, Uddin et Sayeed, 1998). La présence de PGE₂ inhibe aussi l'expression du CMH de classe II (CMH II) chez les CPA, induisant une diminution de la présentation antigénique et de l'activation des lymphocytes T (Stephan et al., 1988). La brûlure induit également une augmentation d'IL-6 sécrétée par les MAC qui, par conséquent, supprime les fonctions des cellules T et la réponse cellulaire après le traumatisme de la brûlure (Zhou, Munster et Winchurch, 1992). Alors que plusieurs soutiennent l'hypothèse que les MAC induisent ces altérations au niveau des cellules T naïves, nous avons noté que l'activation de ces cellules T est diminuée indépendamment des MAC (Patenaude et al., 2005).

La brûlure sévère peut engendrer directement des effets néfastes sur les lymphocytes T. Il a été établi que les voies biochimiques d'activation des cellules T, incluant l'élévation de Ca^{2+} ainsi que l'activation des tyrosines kinases (Fyn, Lck, Zp70), sont fortement altérées suite à une brûlure sévère (Sayeed, 1996). Ainsi, une diminution de l'activation des tyrosines kinases induit une baisse de l'activité de la PLC- γ qui provoque une réduction de la mobilisation de Ca^{2+} intracellulaire des cellules T (Sayeed, 2000). De plus, il a été démontré qu'une baisse des niveaux de Ca^{2+} chez les cellules T isolées d'un modèle murin de la brûlure sévère a pour effet de supprimer l'activation de la ERK1/2 et de la p38 MAPK et par conséquent d'inhiber la production de cytokines Th1 (IL-2, IFN- γ) (Fazal, Choudhry et Sayeed, 2005).

Un principe important qui émerge de l'étude des cytokines est que la nature et l'amplitude de la réponse immunitaire est influencée par la libération des diverses cytokines produites aux sites de stimulation des lymphocytes T. Suite à l'évaluation des cytokines produites après une brûlure sévère, plusieurs études ont démontré un changement de la réponse de type Th1 vers une réponse de type Th2 (O'Sullivan et al., 1995). Lors de la phase tardive suivant une brûlure sévère, l'augmentation de synthèse des cytokines IL-4, IL-10 ainsi que des PGE_2 a pour effet d'inhiber la synthèse des cytokines de type Th1 telles que, IL-12 et IFN- 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). De plus, la présence d'IL-10 a pour effet d'inhiber l'expression des molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CMH II des CPA favorisant ainsi l'induction d'anergie des cellules T lors de la présentation antigénique (Ding et Shevach, 1992; Ding et al., 1993). La production soutenue d'IL-10 durant la phase tardive de la brûlure sévère corrèle avec l'apparition de chocs septiques chez les patients et une diminution à répondre aux infections secondaires chez le modèle murin (Lyons et al., 1997b).

Chez les patients brûlés, il a été noté une baisse significative d'IL-12 produite par les monocytes/MAC périphériques (Goebel et al., 2000). Dans le modèle murin de la brûlure sévère cette baisse a été observée au niveau des MAC de la rate (Goebel 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 dans la phase tardive 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). 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'IFN- γ , les cellules T cytotoxiques sont également affectées suite au traumatisme (Gill, 1993). Ces diverses études suggèrent que l'effet délétère de la brûlure sévère sur les lymphocytes T est donc d'origine multifactorielle et provoque une suppression de l'immunité cellulaire.

1.3.2.2 Les cellules T_{reg} CD4⁺CD25⁺

La majorité des cellules T régulatrices sont CD4⁺, bien qu'il existe de petites populations de cellules T régulatrices CD8⁺. Leur rôle est de supprimer ou de prévenir l'auto-immunité en inhibant l'activité des lymphocytes T. Ces lymphocytes contrôlent l'activation des cellules T en sécrétant des cytokines inhibitrices (IL-10, TGF- β , IL-4). L'action inhibitrice des cellules T CD4⁺CD25⁺ peut également se faire par un contact cellules-cellules via l'expression du CLTA4, du récepteur du TNF induit par les glucocorticoïdes (GITR) ou par l'expression de TGF- β , et se résume à l'inhibition de la transcription du gène de l'IL-2 des cellules T auto-réactives (von Boehmer, 2005). De plus, elles ont la capacité d'induire l'apoptose et d'inhiber la production de tryptophane chez les cellules-cibles (Fallarino et al., 2003; Venet et al., 2006). Les cellules CD4⁺CD25⁺ expriment certains TLRs et peuvent être ainsi activées en présence de LPS. Considérant leurs propriétés immunosuppressives et leur rôle dans le processus d'infections, ces dernières ont un rôle à jouer dans l'apparition des troubles immunitaires lors de la période post-brûlure. L'équipe de Lederer et ses collaborateurs avaient préalablement démontré que l'activité de la réponse inflammatoire est grandement amplifiée chez des souris Rag^{-/-}, souris déficientes en cellules T et B, soumises à une brûlure sévère en comparaison avec des souris normales (Paterson et al., 2003; Shelley et al., 2003). Ils ont observé que cette hyperactivation de la réponse inflammatoire est attribuable aussi à l'absence de

cellules T_{reg} chez les souris $Rag^{-/-}$ (Murphy et al., 2005). En absence de cellules T_{reg} $CD4^{+}CD25^{+}$, il y a une production accrue de $TNF-\alpha$, d' $IL-1\beta$ et d' $IL6$ par les MAC isolées de la rate au 7^e jour post-brûlure. Ainsi, ces cellules ont un rôle à jouer dans l'inhibition de l'hyperactivation des MAC et de l'aggravation de la réponse inflammatoire après une brûlure sévère. Une étude récente a démontré que l'induction d'une brûlure sévère enclenche l'activité régulatrice des cellules T $CD4^{+}CD25^{+}$ présentes dans les ganglions au 7^e jour (MacConmara et al., 2006). L'activation des cellules T $CD4^{+}CD25^{+}$ via leur TLR4 induit une augmentation de la production d' $IL-10$ et de l'expression membranaire du $TGF-\beta$ inhibant ainsi la prolifération des cellules T $CD4^{+}CD25^{-}$ par le mécanisme de contact cellules à cellules (MacConmara et al., 2006).

1.4 La brûlure sévère et les cellules B

La réponse des lymphocytes B est souvent associée et dépend de la régulation de la réponse des cellules T. De ce fait, il n'est pas surprenant de constater que la réponse humorale induite par les lymphocytes B soit également perturbée suivant le traumatisme d'une brûlure sévère. Le pourcentage de lymphocytes B diminue dans les 48 premières heures suivant la brûlure pour ensuite revenir à des niveaux hautement supérieures lors de la phase tardive (14-21 jours) (Organ et al., 1989). Cette diminution de lymphocytes B dans la zone marginale de la rate est liée à l'augmentation de médiateurs, tel que les PGE_2 , sécrétés par les MAC (Maekawa et al., 2002). La diminution de lymphocytes B peut être également la résultante d'une augmentation d'apoptose (Teodorczyk-Injeyan et al., 1995), par la présence de médiateurs cytotoxiques (Nishimura et al., 1999) ($TGF-\beta$, $IL-1$, glucocorticoïdes) ou par la diminution de cellules T effectrices. De plus, les brûlures profondes et étendues provoquent une diminution des fonctions humorales comme en attestent la diminution du taux de production des immunoglobulines (Ig), et la formation de complexes qui attaquent la membrane cellulaire entraînant l'inflammation et la cytolysse. Il a été observé, chez les patients et chez le modèle animal, une diminution du taux de production des immunoglobulines (IgG, IgA, IgM, IgD et IgE) entre 0 et 2 jours suivant la brûlure sévère (Alexander et Moncrief, 1966; Arturson et al., 1969). Les niveaux d'IgG et d'IgA sont les sous-familles d'Ig les plus gravement affectées

suite à une brûlure sévère. La production d'IgM est aussi perturbée et peut-être à l'origine de l'atténuation d'une réponse adéquate suite à une infection avec *P. aeruginosa*, infection couramment observée chez les patients gravement brûlés (Kinoshita et al., 2006; Nishimura et al., 1999). Lederer et ses collaborateurs ont également démontré un lien de causalité entre la baisse de cytokines de type Th1 et la formation d'Ac IgG2a post-brûlure (Kelly et al., 1999).

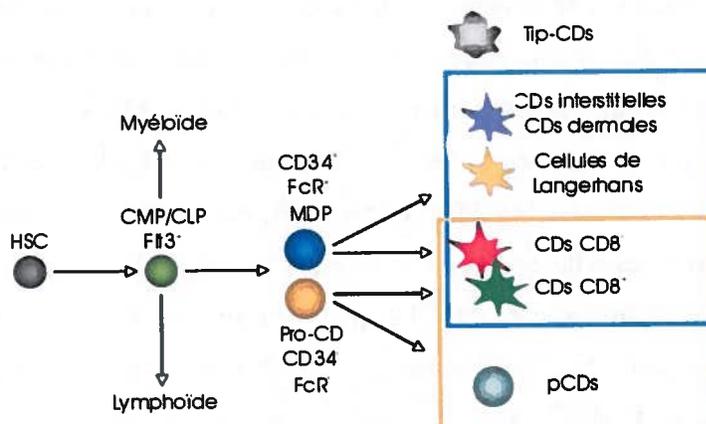
En conclusion, il est clair que les brûlures sévères sont un des traumatismes affectant l'ensemble des fonctions de l'immunité. Cependant, les données portant sur les compétences des CD4 suivant une brûlure sévère sont peu nombreuses. Ainsi, la caractérisation des mécanismes régulant ces déficits immunitaires, plus spécifiquement chez les CD4, est essentielle à la compréhension de l'immunomodulation suivant ce traumatisme et à l'innovation de nouvelles approches thérapeutiques.

2. LES CELLULES DENDRITIQUES

Au sein du système immunitaire, les CD_s sont spécialisées dans l'initiation et le contrôle des réponses immunitaires. Tout d'abord, elles ont été observées dans la peau en tant que cellules de Langerhans. Ce n'est qu'en 1985 que leur caractérisation n'a réellement commencé lorsqu'elles ont été identifiées dans la rate (Banchereau et Steinman, 1998). Les CD_s possèdent une habilité, hautement supérieure à toute autre CPA, pour activer les cellules T et initier leur prolifération (Inaba et Steinman, 1984). Les mécanismes utilisés par les CD_s pour transmettre l'information du milieu environnant aux cellules T sont ceux qui initient la maturation et la migration des CD_s. Ainsi, de part leur niveau de stimulation les CD_s peuvent à la fois jouer un rôle dans l'initiation de l'immunité et dans l'induction de la tolérance immunologique. Les CD_s apparaissent donc de plus en plus comme de véritables chefs d'orchestre de la réponse immunitaire et constituent des outils puissants permettant la manipulation du système immunitaire normal et pathologique.

2.1 DÉVELOPPEMENT DES CELLULES DENDRITIQUES

Les CD_s proviennent des cellules souches hématopoïétiques (HSC) de la moelle osseuse (**Figure 3**) et sont produites à partir des précurseurs médullaires exprimant le CD34. La caractérisation d'autres marqueurs, tels que le Flt3, le CD16/CD32, sur les précurseurs CD34⁺ a permis de classer les CD_s en deux sous-types se différenciant par leur origine de type myéloïde ou lymphoïde.



(Figure adaptée de Naik, 2008)

Figure 3 : Schéma du développement des cellules dendritiques *in vivo*. Chez l'homme, ces cellules précurseurs CD34⁺ se différencient dans la moelle osseuse en cellules progénitrices de type myéloïde (CMP – *commun myeloid progenitor*) ou en cellules progénitrices de type lymphoïde (CLP – *commun lymphoid progenitor*), qui expriment toutes le Flt3. Ces derniers donnent naissance à d'autres précurseurs que l'on nomme les MAC-CD précurseurs (MDP) et les pro-CDs. Les MDP sont majoritairement CD34⁺CD16/CD32⁺ alors que les pro-CDs sont CD34⁺CD16/CD32⁻. À partir des MDP peuvent être générés les monocytes qui à leur tour se différencieront, en présence de stimuli inflammatoires, en Tip-CDs, cellules de Langerhans ou CD8 interstitielles/dermales. Les sous-populations de CD8α⁻ et CD8α⁺ peuvent également provenir des précurseurs MDP. Les pro-CDs (CD11c⁻CMH II⁻) se différencient en pré-CDs (CD11c⁺CMH II⁻) afin de donner les sous-populations de CD8 résidents dans les organes lymphoïdes, soient les CD8 plasmacytoïdes, les CD8α⁻ et les CD8α⁺.

2.1.1 Les cellules dendritiques d'origine myéloïde

L'origine myéloïde des CD8 a été mise en évidence suite à l'observation d'une reconstitution complète des sous-populations de CD8 au niveau de la rate et du thymus chez des souris irradiées ayant reçu une transplantation de précurseurs communs myéloïdes (CMPs – *common myeloid progenitors*) (Manz et al., 2001a). D'autres études ont par la suite démontré qu'à partir d'une fraction de CMPs exprimant le récepteur pour Flt-3L, qu'il était possible de différencier toutes les sous-populations de CD8 au niveau du thymus et de la rate. Les CD8 myéloïdes sont des plus connues tant chez l'humain que chez la souris. Les cellules de Langerhans (de l'épiderme), les

CDs interstitielles des tissus périphériques (comme le derme) et les CDs obtenues à partir des monocytes appartiennent à cette population.

2.1.2 Les cellules dendritiques d'origine lymphoïde

Chez les CDs du thymus et certaines sous-populations de CDs de la rate, une expression de marqueurs spécifiques aux cellules lymphoïdes a été observée incluant la glycoprotéine CD8 α , le CD4, le CD2, le BP1, CD25 et le DEC-205 (Vremec et al., 1992) suggérant ainsi une origine lymphoïde. Par la suite, l'existence de ces CDs d'origine lymphoïde a été démontré grâce à des expériences de transplantation de précurseurs intra-thymiques lymphoïdes spécifiques chez des souris irradiées. Chez ces dernières, une augmentation du nombre de cellules T et de CDs conventionnelles (cCDs) CD8 α^+ au niveau du thymus a été observée (Ardavin et al., 1993; Wu et al., 1995). De plus, ces précurseurs ont la capacité de générer des cellules cCDs CD8 α^+ et CD8 α^- au niveau de la rate lorsqu'ils sont injectés par voie intraveineuse (Wu, Li et Shortman, 1996; Martin et al., 2000). Enfin, des études ont démontré que des précurseurs CLP pouvaient également se différencier en diverses sous-populations de CDs autant *in vivo* qu'*in vitro* (Manz et al., 2001b). Les CDs lymphoïdes dérivent d'un précurseur commun aux cellules B, T et NK soit les CLP. Elles sont présentes dans le thymus et dans les organes lymphoïdes secondaires. Néanmoins, l'absence de marqueurs spécifiques des CD lymphoïdes humaines rend difficile l'identification exacte de leur origine. Chez l'homme, des CDs d'origine lymphoïde peuvent être identifiées selon leur morphologie inhabituelle de type plasmacytoïde trouvées dans les amygdales et qui sont appelées parfois « cellules T plasmacytoïdes ».

Il est maintenant établi que les sous-populations de CDs présentes dans la rate et le thymus peuvent être générées autant à partir de précurseurs CLP ou CMP. Ainsi, le phénotype de CDs et leur localisation ne caractérisent pas spécifiquement leur origine. Cette complexité et flexibilité observées au niveau du développement des CDs laisse penser que la différenciation des CDs est d'une importance cruciale dans le bon fonctionnement du système immunitaire. Cette flexibilité est probablement qu'un simple mécanisme de redondance permettant de préserver la différenciation de cette population cellulaire en tout temps. Cependant, ceci reste à être confirmé.

2.2 SOUS-POPULATIONS DE CELLULES DENDRITIQUES

Les sous-populations de CD_s peuvent se différencier suivant des critères spécifiques. Premièrement, l'on peut différencier les CD_s selon qu'elles soient des cellules précurseurs ou des CD_s. Deuxièmement, la différenciation des CD_s peut se faire selon leur pouvoir migratoire. Ainsi, l'on retrouve des CD_s qui migrent des tissus périphériques aux organes lymphoïdes via la voie lymphatique (CD_s migratoires), celles qui résident dans les organes lymphoïdes (CD_s résidentes) ou bien des CD_s qui migrent de la moelle osseuse vers le sang périphérique (CD_s circulantes). Troisièmement, les CD_s peuvent être classées selon leur environnement. Les CD_s dites stationnaires (*steady-state*) sont celles qui se retrouvent dans un environnement sans stimulus, alors que les CD_s dites inflammatoires sont présentes lors d'une réponse inflammatoire. Quatrièmement, ces cellules se différencient selon les diverses sous-populations de CD_s existantes. Cinquièmement, le classement peut se faire selon le niveau d'activation des CD_s (CD_s inactivées versus activées). Chacune de ces caractéristiques s'associe à de multiples sous-populations de CD_s (Naik, 2008).

2.2.1 Les pré-cellules dendritiques

Les pré-CD_s se différencient à partir de précurseurs CMP ou CLP exprimant le Flt3. Il s'agit de cellules qui ne possèdent ni la forme spécifique des CD_s, à savoir l'apparence de dendrites, ni leurs fonctions. Toutefois, elles se caractérisent par leur capacité à se différencier en diverses sous-populations de CD_s. Ces pré-CD_s peuvent se retrouver dans la rate, où elles représentent 0.05% des splénocytes, dans les ganglions ou encore dans la circulation sanguine (Naik et al., 2006). Il existe trois grandes catégories de cellules pré-CD_s.

La première consiste à des CD_s immatures ayant comme phénotype CD45RA⁻(B220)⁻CD11c^{int}CD11b⁺ et qui acquièrent la morphologie et les fonctions spécifiques des cCD_s matures en présence de stimuli microbiens (Takeuchi et Furue, 2007).

La seconde catégorie de pré-CD_s, ayant comme phénotype CD45RA⁺(B220⁺)CD11c^{lo}CD11b⁻, se nomme les pré-CD_s plasmacytoïdes (pCD_s) et

se retrouvent dans plusieurs tissus chez la souris dont le sang, le thymus, la moelle osseuse, le foie et les organes lymphoïdes. En présence d'IL-3 ou de stimuli microbiens (bactéries, oligonucléotides dinucléotides cytosine phospho guanine (CpG)), les pré-CDs plasmacytoïdes peuvent se différencier en cCDs matures qui migreront vers les organes lymphoïdes par la voie de la L-sélectine CD62L (Soumelis et Liu, 2006). Leur différenciation se caractérise par un changement de leur morphologie spécifique de forme ronde, de leur capacité à produire de l'IFN de type I, et à l'apparition de dendrites et des fonctions effectrices des cCDs (Grouard et al., 1997). Chez l'homme, les pDCs ont comme phénotype $CD4^+CD45RA^+IL-3R\alpha$ ($CD123^+ILT3^+ILT1^+CD11c^-$) alors que chez la souris, les pCDs expriment les marqueurs de surface B220, Ly6C et CD11c et aucunement l'IL-3R α ($CD123$) (Colonna, Trinchieri et Liu, 2004). Les pCDs dites stationnaires expriment peu la glycoprotéine CD8 α , dont l'expression est fortement augmentée lorsque les pCDs sont activées.

Les pré-CDs plasmacytoïdes peuvent également se différencier en CDs plasmacytoïdes-productrices-d'IFN de type I (IPCs *-professional type I IFN-producing cells*) en présence d'ADN ou d'ARN viraux (Demling et Seigne, 2000; Soumelis et Liu, 2006). Les IPCs peuvent se retrouver au niveau du sang, du thymus, de la moelle osseuse et dans les tissus des organes lymphoïdes. Elles sont caractérisées par leur forme ronde, leur morphologie inhabituelle « plasmacytoïde » et leur grande capacité à produire de l'IFN de type I lorsqu'il y a infection virale ou bactérienne. Leur capacité à produire de grandes quantités d'IFN de type I leur confère un rôle de régulateur de l'inflammation et de lien entre l'immunité innée et acquise. Les pCDs expriment des TLRs spécifiques, dont le TLR7 et le TLR9, au niveau de leurs compartiments endosomaux leur permettant de reconnaître l'ADN et l'ARN virale. L'activation des pCDs murins par leurs TLRs initie la sécrétion d'IFN de type I, cytokine jouant un rôle dans l'enclenchement de l'activité cytolytique des cellules NK. L'IL-12p70 produite par les pCDs activées favorise aussi la sécrétion d'IFN- γ des cellules NK (Krug et al., 2004). La présence d'IFN de type I contribue à l'activation des cellules T, observée par une augmentation du marqueur d'activation précoce CD69 chez les lymphocytes T (Agnello et al., 2003). Les pCDs jouent un rôle dans le maintien des cellules T dites mémoires, l'initiation d'une réponse de type Th1 et la production d'IFN- γ par les lymphocytes T. Toutefois, il a

été démontré que les pCDs activées en présence du ligand CD40 (CD40L) et d'IL-3, sans stimulation via leurs TLRs, favorise une réponse de type Th2. Il a également été démontré que les pCDs sont impliquées dans la différenciation, la maturation des cCDs et augmentent leurs fonctions immunostimulatrices via la sécrétion d'IFN de type 1 (Santini et al., 2000). Les pCDs favorisent également la production d'IgG chez les lymphocytes B activés, par leur production d'IFN de type 1 et de l'IL-6 (Jego et al., 2003b; Poeck et al., 2004).

Il existe une troisième catégorie de pré-CDs soit les monocytes. Les monocytes peuvent être des pré-CDs provenant de précurseurs nommés précurseurs MAC-CDs (MDP – *MAC-dendritic cells precursors*) de la lignée myéloïde (Fogg et al., 2006). Ils se retrouvent dans la circulation sanguine, la moelle osseuse et, en moindre quantité, dans la rate. Lors d'une infection ou d'une réponse inflammatoire, les monocytes pré-CDs sont recrutés dans la circulation sanguine et les organes. On retrouve deux sous-populations de monocytes murins soit les Ly6C^{hi} et les Ly6C^{low} correspondant aux monocytes humains CD14⁺ et CD16⁺CD14⁺, respectivement (Geissmann, Jung et Littman, 2003a). Autant chez la souris que chez l'homme ces cellules ont la capacité de se différencier en MAC en réponse au M-CSF (Becker, Warren et Haskill, 1987) ou en CD11c⁺CMH II⁺ CDs en présence de facteur de croissance hématopoïétique des granulocytes et des MAC (GM-CSF - *granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*) avec ou sans IL-4 (Inaba et al., 1992).

2.2.2 Les cellules dendritiques conventionnelles

Ces CDs dites conventionnelles (cDCs) expriment le CD11c⁺, possèdent la forme particulière des CDs et leurs fonctions primaires. Elles se retrouvent au niveau des organes lymphoïdes primaires et secondaires tels que les ganglions, la rate, le thymus, des organes non-lymphoïdes et dans la circulation. Les cCDs peuvent se subdiviser en plusieurs sous-populations. Shortman et Naik ont classées ces cCDs en deux grandes familles, soit les cCDs migratoires et les cCDs résidant dans les tissus lymphoïdes (Shortman et Naik, 2007).

i. Les cellules dendritiques migratoires

Les cDCs migratoires sont les CD dites classiques qui agissent en tant que cellules sentinelles dans les tissus périphériques. Une fois qu'elles rencontrent et reconnaissent un agent pathogène, celles-ci deviennent matures et migrent vers les ganglions via la voie lymphatique afin de présenter l'Ag aux cellules T (Henri et al., 2001). Les cellules de Langerhans ou les CD dermales/interstitielles font partie de cette catégorie de cDCs migratoires. Récemment, il a été démontré que 3 sous-populations de CD dermales (dCDs) coexistaient dans le derme et se différenciaient selon l'expression du CD11b et de leur comportement migratoire. Chez la souris, les dCDs se divisent en $\text{Langerin}^+\text{CD11b}^{\text{low}}$, $\text{Langerin}^-\text{CD11b}^+$ et $\text{Langerin}^-\text{CD11b}^{\text{low}}$ (Shklovskaya, Roediger et Fazekas de St Groth, 2008). Les CD dermales/interstitielles migreraient via le sang dans les ganglions lymphatiques et participeraient à la stimulation de l'immunité humorale. Dans les ganglions lymphatiques, l'on retrouve des cDCs migratoires ayant un phénotype $\text{CD8}^{\text{low}}\text{CD205}^{\text{high}}$ ou $\text{CD8}^{\text{low}}\text{CD205}^{\text{low}}$. Il a été démontré que les CD $\text{CD8}^{\text{low}}\text{CD205}^{\text{low}}$ retrouvées dans les ganglions sous-cutanés s'apparentaient aux CD dérivées des tissus interstitiels (Henri et al., 2001).

La seconde catégorie de CD migratoires, les cellules de Langerhans, sont caractérisées par leur phénotype $\text{Langerin}^+\text{CD11b}^{\text{int}}$, sont dépendantes du TGF- β et représentent environ 2 à 4% des cellules dites sentinelles de l'épiderme. L'origine de ces cellules n'est pas encore élucidée. Deux hypothèses existent, soit que ces cellules se différencient à partir de précurseurs présents dans la circulation, tels que les monocytes (Ginhoux et al., 2006), ou encore qu'elles s'auto-différencient à partir d'une cellule de Langerhans (Krueger, Daynes et Emam, 1983; Ginhoux et al., 2007). Tout récemment, l'équipe de Shklovskaya a démontré pour la première fois que les cellules Langerhans peuvent initier l'activation des cellules T CD4^+ naïves face à un Ag sous-cutané (Shklovskaya, Roediger et Fazekas de St Groth, 2008). Un grand pourcentage des CD présentes dans la région paracortex des ganglions sous-cutanés est $\text{CD8}^{\text{low}}\text{CD205}^{\text{high}}$ et s'apparente aux cellules de Langerhans (Henri et al., 2001). Ainsi, les cellules de Langerhans sont principalement impliquées dans la réponse précoce de l'immunité acquise suivant une infection dans l'épiderme ou le derme.

ii. Les cellules dendritiques résidentes

La deuxième sous-catégorie, soit les cDCs résidant dans les tissus lymphoïdes, migrent peu et leurs fonctions sont restreintes à un organe lymphoïde spécifique (Naik, 2008). Ces cDCs vont surtout internaliser les Ags qui sont présents dans les organes lymphoïdes. On retrouve principalement cette sous-population de cDCs au niveau du thymus, de la rate et des ganglions lymphatiques. Chez la souris, la population de cDCs qui réside dans la rate se divise en trois sous-populations, basées sur l'expression du CD8 α . On retrouve les cDCs qui n'expriment pas le CD8 α , qui regroupent les cDCs CD4 $^{-}$ CD8 α^{-} ou les cDCs CD4 $^{+}$ CD8 α^{-} , et celles qui expriment cette molécule, les cDCs CD4 $^{-}$ CD8 α^{+} (Neuenhahn et Busch, 2007). Ces deux sous-populations de cDCs ont fait l'objet de plusieurs études au courant des dernières années. C'est en 1996 que l'équipe de Shortman a démontré l'existence de ces deux sous-populations de cDCs. À cette époque l'on croyait, due à l'expression de cette glycoprotéine CD8 α , que les cDCs CD8 α^{+} étaient d'origine lymphoïde alors que les cDCs CD8 α^{-} étaient d'origine myéloïde (Wu, Li et Shortman, 1996; Wu et al., 1997). Cependant, cette croyance fût abolie suite à la démonstration que les deux sous-populations de cDCs pouvaient être générées à partir d'un seul précurseur précoce lymphoïde CD4 $^{\text{low}}$ du thymus (Martin et al., 2000). Par la suite, Weissman et ses collègues ont démontré que les cDCs CD8 α^{+} et CD8 α^{-} peuvent être générées autant à partir de précurseurs CLP que de précurseurs CMP (Traver et al., 2000). Toutefois, la différenciation des cDCs à partir de précurseurs lymphoïdes ou myéloïdes restent encore à être étudiée puisqu'elle peut fluctuer selon divers facteurs dont les conditions environnementales, la présence de médiateurs inflammatoires, et autres.

Au niveau de la rate, le ratio de cDCs CD8 α^{-} et cDC8 α^{+} est de 3:1, alors qu'au niveau du thymus les cDCs qui y résident sont majoritairement CD8 α^{+} . Dans la rate les cDCs CD8 α^{-} se retrouvent au niveau des zones marginales, endroit où elles internalisent l'Ag. On retrouve essentiellement les cDCs CD8 α^{+} dans les zones riches en cellules T, soit la pulpe blanche de la rate et le paracortex des ganglions lymphatiques. On retrouve dans les deux sous-populations des cDCs immatures et partiellement matures qui une fois activées, entreront dans un processus de maturation (discuté ultérieurement). Certaines études tentent de démontrer que les cDCs CD8 α^{+} dérivent

des cCDs CD8 α ⁻ suite à une maturation de ces dernières (Brasel et al., 2000; Martinez del Hoyo et al., 2002). Ainsi, les cCDs CD8 α ⁻ augmentent l'expression du CD8 α ainsi que d'autres marqueurs spécifiques aux cellules cCDs CD8 α ⁺, lorsqu'elles sont activées. Il a également été démontré une augmentation de l'expression de la molécule CD8 α chez les cCDs différenciées *in vitro* en présence de Flt-3L suivant à une stimulation aux LPS (Brasel et al., 2000). Toutefois, l'équipe de Naik et al. a contredit cette affirmation par des expériences d'enrichissement de CDs chez un modèle murin, où seulement 0.16% des cCDs CD8 α ⁺ obtenues provenaient des cCDs CD8 α ⁻ (Naik et al., 2003). Ils concluent plutôt que l'origine des cCDs CD8 α ⁺ serait de précurseurs de CDs immatures présents dans la zone marginale, qui sont encore inconnus. Bien que l'origine de ces deux sous-populations demeure encore à être élucidée, plusieurs études ont démontré que leurs fonctions sont distinctes (discutés ultérieurement).

2.2.3 Les cellules dendritiques différenciées en présence de Flt-3L

Le facteur de croissance hématopoïétique Flt-3L, a d'abord été utilisé par l'équipe de Maraskovsky afin de permettre une expansion de CDs (Maraskovsky et al., 1996). Suite à des injections intraveineuses (i.v.) de Flt-3L, une augmentation du nombre de CDs a été observée. Deux sous-populations de CDs d'origine myéloïde et lymphoïde ont été obtenues. Par la suite, l'équipe de Brasel a mis au point une technique de différenciation *in vitro* des précurseurs de la moelle osseuse en CDs utilisant le Flt-3L comme facteur de croissance. La stimulation des précurseurs de la moelle osseuse à l'aide de Flt-3L permet d'obtenir une population de CDs, communément appelée les FLDCs. Ces FLDCs présentent des propriétés similaires aux cCDs, dites stationnaires, résidant dans les organes lymphoïdes (Brasel et al., 2000). Tel qu'observé à la suite d'un traitement *in vivo* au Flt-3L chez la souris, les FLDCs se différencient en deux sous-populations de CDs définies par leur phénotype à savoir : une sous-population myéloïde CD11b^{high}CD11c⁺CD8 α ⁻ et une sous-population lymphoïde CD11b⁻CD11c⁺CD8 α ⁺. Toutefois, l'utilisation de l'expression de la glycoprotéine CD8 α comme agent marqueur des sous-populations de FLDCs est peu recommandable puisque ces dernières l'expriment très peu à l'état basal (Brawand et al., 2002; Gilliet et al., 2002). Ainsi, il a été établi que la différenciation des sous-

populations de FLDCs peut préalablement se faire selon l'expression du CD45RA. L'on retrouve donc la sous-population CD45RA⁺, regroupant les cCDs, et la sous-population CD45RA⁻, représentant les CDs plasmacytoïdes de la rate (Brasel et al., 2000). Les FLDCs CD45RA⁻ peuvent à leur tour se différencier selon l'expression de marqueurs de surface tels que le CD24 et le CD11b (Naik et al., 2005). Comme la molécule CD24 est exprimée chez les cCDs CD8 α ⁺ de la rate (Vremec et al., 2000), il a été proposé que les FLDCs exprimant celle-ci correspondent à la sous-population des cCDs CD8 α ⁺. À l'opposé, les FLDCs exprimant le CD11b^{high} correspondent donc à la sous-population de cCDs CD8 α ⁻. Une autre similarité observée entre les sous-populations des FLDCs et celles de la rate, est que les FLDCs CD24^{high} et les cCDs CD8 α ⁺ expriment toutes deux le facteur de transcription IRF-8 et l'inhibiteur de protéase à cystéine CyC (Naik et al., 2005). Par contre, seules les FLDCs CD11b^{high} et les cCDs CD8 α ⁻ expriment le facteur de transcription IRF-4 (Naik et al., 2005). Les FLDCs peuvent donc être classées en trois sous types de CDs soit les CD24^{high} (CD8 α ⁺), les CD11b^{high} (CD8 α ⁻) et les pDCs et représentent donc un excellent outil pour l'étude de la biologie des CDs.

2.2.4 Les cellules dendritiques inflammatoires

Récemment, une nouvelle catégorie de CDs, qui ne se retrouvent pas dans un état de quiescence (de non stimulation), a été identifiée lors du processus inflammatoire ou en présence de stimuli microbiens. Ces CDs sont dites inflammatoires (iCDs). Lors d'une infection à la *Listeria monocytogenes* (Serbina et al., 2003) ou encore lors de psoriasis (Lowe et al., 2005), ces cellules produisent du TNF- α et expriment la forme inducible iNOs, d'où l'interpellation de Tip-DCs (TNF- α and iNO synthase-producing DCs). Les Tip-DCs ont un phénotype unique exprimant les molécules CD11c^{int}CD11b^{high}MAC-3⁺. Les Tip-DCs expriment aussi des niveaux élevés de marqueurs de co-stimulation et de la molécule CMH II. Elles sont capables d'activer les cellules T alloréactives. Il a été proposé que ces cellules Tip-DCs proviendraient de monocytes Gr-1⁺, qui se retrouvent au niveau des sites d'inflammation, et migreraient dans les organes lymphoïdes via l'expression du récepteur à chimiokines CCR2 (Geissmann, Jung et Littman, 2003b). En présence d'infection avec des bactéries intracellulaires, les Tip-DCs jouent un rôle essentiel dans l'orchestration

dans la réponse immunitaire innée.

2.2.5 Les cellules dendritiques différenciées à l'aide de GM-CSF

Le facteur de croissance GM-CSF a longuement été utilisé pour l'étude des CD_s résidentes des organes lymphoïdes. En 1992, Inaba et ses collaborateurs ont été la première équipe à mettre au point une technique de différenciation des précurseurs de la moelle osseuse en CD_s en présence de GM-CSF (GMDCs) (Inaba et al., 1992). Par la suite, plusieurs équipes de recherche ont étudié ces CD_s dérivées de cellules de la moelle osseuse ou encore à l'aide de monocytes. Il a été démontré que les GMDCs expriment plusieurs récepteurs TLRs (TLR2, TLR4, TLR5, TLR7 et TLR9) qui sont essentiels à leur activation et à la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70 et TNF- α) (Dowling, Hamilton et O'Neill, 2008; Dearman et al., 2008a). Bien que cette population de CD_s différenciées *in vitro* arbore des caractéristiques similaires aux CD_s *in vivo*, il a été proposé que ces dernières s'apparentent plus aux Tip-CD_s. De part leur phénotype CD11c⁺CD11b⁺CD8 α ⁻CMH II⁺, l'on croyait que les CD_s différenciées en présence de GM-CSF et d'IL-4 s'apparentaient à la sous-population de CD_s CD8 α ⁻ résidant dans les organes lymphoïdes et dans la rate. Toutefois, plusieurs données scientifiques ont contredit cette comparaison. Premièrement, le facteur de croissance GM-CSF ne contribue pas à la génération de CD_s stationnaires *in vivo* puisque les niveaux de cette cytokine sont pratiquement non détectables chez la souris non-infectée et chez l'humain sain (Cebon et al., 1994; Cheers et al., 1988; Zwierzina et al., 1992). Deuxièmement, les études portant sur les « knockouts » du gène GM-CSF ou de son récepteur n'a aucunement influencé le nombre de CD_s et de ces sous-populations ainsi que de leur proportion respective au niveau de la rate (Hikino et al., 2000; Vremec et al., 1997). Finalement, la cytokine responsable de la génération des CD_s non-activées *in vivo* semble être le Flt-3L puisqu'aucune CD n'est générée chez des souris déficientes Flt-3L^{-/-} (McKenna et al., 2000). De plus, l'équipe de Xu a clairement établi la ressemblance entre les GMDCs et les Tip-CD_s (Xu et al., 2007). Ainsi, les GMDCs sont de larges cellules granuleuses, ayant un phénotype CD11c⁺CMH II⁺MAC-3⁺, qui produisent du TNF- α et de l'iNOS en réponse à divers ligands spécifiques des TLRs. Tout comme pour les Tip-CD_s, les GMDCs produisent en grande quantité la chimiokine CCL2 et la

cytokine IL-10 suite à l'activation de leurs TLRs, en comparaison avec les FLDCs. Tous ces paramètres permettent de penser que les GMDCs s'apparentent au Tip-CDs plutôt que les CD_s résidant dans les organes lymphoïdes.

2.3 PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES DES CELLULES DENDRITIQUES

À noter que les propriétés fonctionnelles, telles que la capture d'Ag et la migration des CD_s, n'ont pas fait l'objet de ce travail de recherche. Ainsi, nous ne nous attarderons pas à détailler celles-ci. Nous avons plutôt étudié les propriétés, telles que la maturation des CD_s ainsi que leur capacité à initier diverses réponses des cellules T, lors du processus inflammatoire.

Les deux fonctions clés des CD_s (prise en charge des agents pathogènes et interactions avec les lymphocytes T) sont séparées dans le temps puisque associées à deux stades de développement différents. Les CD_s immatures sont d'excellentes cellules pour capter et internaliser efficacement une grande variété d'agents pathogènes selon trois mécanismes distincts (Banchereau et al., 2000). Les CD_s peuvent capturer des Ags par pinocytose, par endocytose via des récepteurs exprimés à leur surface ou par phagocytose de particules, tels que des fragments de cellules apoptotiques ou nécrotiques, des virus, des bactéries ou des parasites intracellulaires (Banchereau et al., 2000; Albert et al., 1998). La capture et la reconnaissance d'agents pathogènes induit généralement la maturation des CD_s. Ces changements morphologiques et phénotypiques de la maturation des CD_s induit l'augmentation de récepteurs spécifiques à des chimiokines qui initieront la migration de ces dernières. Le patron de migration des CD_s peut varier selon le type de CD_s, le stade de développement et le niveau d'activation. Les CD_s ont donc la propriété de pouvoir migrer soit du sang aux tissus périphériques, des tissus périphériques aux organes lymphoïdes ou encore de la zone marginale vers la zone riche en cellules T. Malgré cette complexité et cette plasticité on peut définir une CD, indépendamment de son origine, par sa richesse en molécules CMH II, mais surtout par sa capacité d'initier la réponse des cellules T.

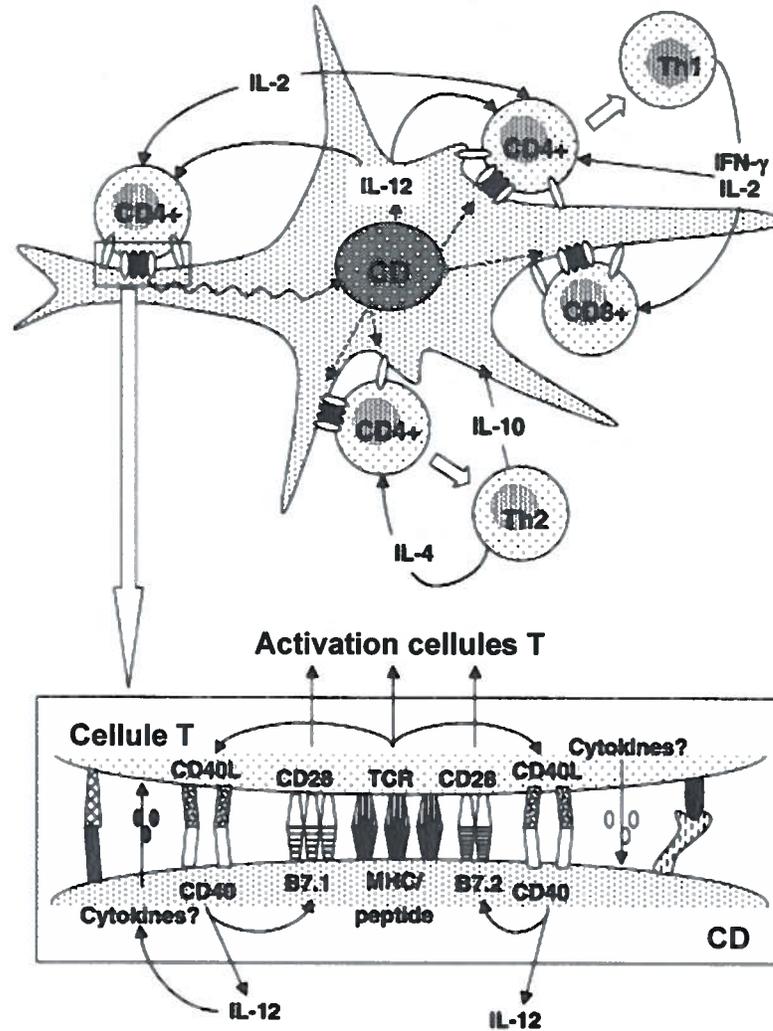
2.3.1 Présentation des antigènes par les molécules de classe II du CMH

L'étude de l'apprêtement et de la présentation de l'antigène dans les CD_s dérivées de monocytes humains ou de cellules de moelle osseuse a permis de mettre en évidence des mécanismes de prise en charge de l'antigène spécifiques aux CD_s. Les lymphocytes T reconnaissent les antigènes protéiques sous forme native via leur récepteur T (*T cell receptor* ou TcR). Ces derniers doivent être présentés aux cellules T par les CPA dans un contexte du « soi ». Pour ce faire, l'Ag sera capturé, clivé en courts peptides et présenté en association avec les molécules du CMH (classe I ou II) ou avec la molécule CD1. Pour les fins de cette thèse, nous discuterons uniquement de la présentation des Ags par les molécules de classe II du CMH.

Les antigènes extracellulaires (provenant de la capture de pathogènes) sont protéolysés dans la voie d'endocytose où ils s'associent généralement, mais non exclusivement, aux molécules de CMH II. L'association du peptide avec les complexes CMH II se fait au niveau de l'endosome ou du lysosome, où un dimère du CMH II s'associera avec des peptides antigéniques sous le contrôle de deux molécules non-polymorphiques HLA-DM/H2-M et HLA-DO/H2- (chez l'humain/souris) (Kropshofer, Hammerling et Vogt, 1999). Les complexes CMH II/peptides antigéniques sont alors dirigés vers la membrane plasmique où ils sont reconnus par les lymphocytes T CD4⁺. Les CD_s peuvent, pendant un temps très court de leur vie, produire des quantités importantes de complexes CMH II/peptide. En fonction de leur état de maturation, elles modulent la production et la stabilité des complexes CMH II/peptide présents à leur surface afin d'optimiser la présentation des antigènes issus d'agents infectieux. Les CD_s immatures expriment peu de complexes CMH II/peptides antigéniques à leur surface dû à la forte activité d'endocytose (Guernonprez et al., 2002). L'induction de la maturation des CD_s suite à la reconnaissance de pathogènes via les TLRs place la CD dans un état intermédiaire. Pendant 24 à 48 heures, la synthèse des molécules CMH II est augmentée de 3 à 4 fois et l'activité d'endocytose est maintenue, ce qui permet une production importante de complexes CMH II/peptides. Enfin, aux stades tardifs de maturation, l'endocytose et la synthèse de molécules de CMH-II diminuent, les complexes CMH II/peptide sont stabilisés à la surface des CD_s et acquièrent une demi-vie de plus de 100 heures. Il a

même été démontré que des CD matures pouvaient générer de nouveaux complexes CMH II/peptides via un recyclage des molécules CMH à la surface (Askew et al., 2000). Cette maturation temporelle permet aux CD de prendre en charge rapidement un maximum de peptides antigéniques et de les présenter à la surface membranaire afin d'augmenter la probabilité de recruter et d'activer d'éventuels lymphocytes T spécifiques.

La reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TcR spécifique de l'antigène et la molécule CMH de classe II par le co-récepteur CD4 constitue le « premier signal » de l'activation des lymphocytes T. Ainsi, le CD4 à la surface des cellules T s'associe au récepteur antigénique et se fixe à des sites invariables de la molécule CMH II qui, avec le peptide antigénique forme le ligand spécifique (Creusot, Mitchison et Terazzini, 2002). De plus, des molécules d'adhérence contribuent à stabiliser la liaison entre les cellules, tels que les molécules d'adhérence LFA-1 qui se lie aux ICAM, ce qui favorise la présentation de l'Ag. Cette liaison est essentielle pour que les cellules T développent une réponse effectrice. Les signaux enclenchés par l'activation du TcR et du co-récepteur, suite à la reconnaissance du complexe CMH II/peptide, conduisent à l'activation des facteurs de transcription chez les cellules T, tels que le facteur nucléaire des lymphocytes T activés (NFAT), AP-1 et NF- κ B. Ces derniers stimulent à leur tour la transcription et la production de cytokines, l'expression des récepteurs à cytokines, l'induction du cycle cellulaire et les molécules effectrices comme CD40L. Toutefois, ce premier signal ne suffit pas à induire la prolifération des lymphocytes T. Tel qu'il est illustré à la **figure 4**, un «second signal» dit de co-stimulation délivré par les CD via des molécules accessoires telles que B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) et CD40 (dont les ligands sont CTLA-4 et CD28 pour les molécules B7, et CD40-L pour le CD40) doit avoir lieu pour permettre l'activation adéquate des cellules T (Creusot, Mitchison et Terazzini, 2002). La sécrétion de cytokines lors de l'interaction CD:cellule T est également essentielle à l'activation des lymphocytes T et à la maturation complète des CD (discuter dans la section 2.3.1.2).



(Figure adaptée de Terazzini et *al.*, 2002)

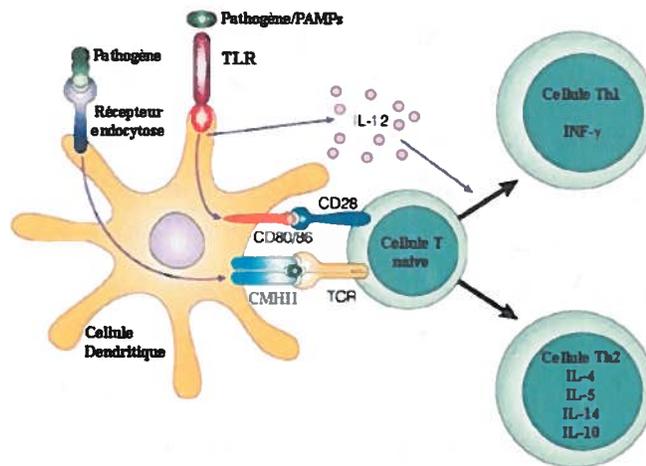
Figure 4 : Synapse immunologique entre une CD:cellule T. La zone de contact, très organisée, entre la cellule T et les CD est appelée synapse immunologique. Les cellules T reconnaissent, via leur TcR et la molécule CD4, des fragments peptidiques qui ont été apprêtés et liés aux CMH II. Les molécules de co-stimulation B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) et CD40 présentes sur les CD et la sécrétion d'IL-12 permettent l'activation adéquate des cellules T. Les signaux venant de la surface cellulaire sont transmis par diverses voies de transduction qui aboutissent à l'expression génique et la sécrétion de cytokines, telles que l'IFN- γ et l'IL-2. Ces dernières enclenchent une réponse de type Th1. Selon les signaux envoyés par les CD, les cellules T nouvellement activées peuvent également sécréter de l'IL-4 et de l'IL-10, favorisant une réponse de type Th2. De plus, les CD sont capables de présenter aux cellules T l'Ag ingéré par l'intermédiaire des molécules de CMH I, processus appelé présentation croisée, et qui résulte en l'activation des cellules T CD8⁺.

2.3.2 La maturation des cellules dendritiques

Les CD_s peuvent se trouver sous deux formes distinctes de maturation. Les CD_s immatures se retrouvent principalement en périphérie et sont caractérisées par un ensemble de molécules de surface et de propriétés fonctionnelles. Elles expriment faiblement les molécules du CMH et de co-stimulation lymphocytaires (CD40, CD80 et CD86). Cela rend les CD_s inefficaces pour stimuler adéquatement les lymphocytes T et permettre leur expansion clonale (Tan et O'Neill, 2005). Différents signaux enclenchent la différenciation des CD_s immatures en CD_s matures. Ainsi, cinq récepteurs ont été identifiés :

- (i) les récepteurs PRR (*pattern-recognition receptors*) qui regroupent les récepteurs scavenger, les récepteurs de type C-lectine (récepteur à mannose, DC-SIGN, DEC-205) ainsi que les TLRs (LPS, motifs CpG) ;
- (ii) les récepteurs à cytokines (TNF- α , l'IL-1 β) ;
- (iii) les molécules de la famille des récepteurs à TNF (TNF-R) ;
- (iv) les récepteurs FcR ;
- (v) et les récepteurs de signaux de danger (HSP60, HSP90, HMGB1) (Guermonprez et al., 2002).

Tel qu'illustré à la **Figure 5**, les CD_s activées par les TLRs, passent du stade tolérogénique au stade immunogénique, essentiel à l'initiation de la réponse immunitaire acquise.



(Figure adaptée de Medzhitov, 2001)

Figure 5 : Rôle des TLRs dans l'activation des cellules dendritiques et dans l'immunité acquise. Les récepteurs TLRs reconnaissent des motifs PAMPs qui initient une cascade d'activation intracellulaire permettant la maturation des CD. L'augmentation des molécules de co-stimulation (CD80 et CD86) et du CMH II ainsi que la production de la cytokine IL-12, sont des éléments essentiels dans l'expansion clonale des cellules T. Selon le type de stimulus et le niveau d'activation reçu par les TLRs, il s'en suit d'une initiation de la réponse Th1 ou de la réponse Th2.

La maturation des CD est intimement liée à une série de changements morphologiques et à l'expression membranaire des molécules du CMH et des molécules de co-stimulation. Parallèlement, la maturation est associée à la production de cytokines, telle que l'IL-12, qui est nécessaire à la stimulation des lymphocytes T (Figure 5).

2.3.2.1 Les molécules de co-stimulation

Il existe trois grandes familles de molécules de co-stimulation, soit la famille de la molécule B7, du récepteur TNF et autres, qui seront détaillées dans les sections suivantes.

a) La famille B7

Les molécules de co-stimulation les mieux caractérisées à ce jour, sont le CD80 (B7.1) et le CD86 (B7.2). Les molécules B7 sont des homodimères de la superfamille des Ig que l'on retrouve uniquement à la surface des cellules qui peuvent stimuler la prolifération des cellules T CD4⁺. Leur rôle dans la stimulation a été démontré par transfection de gènes codant pour la molécule B7 dans des fibroblastes qui expriment des épitopes pour les cellules T. Ces fibroblastes transfectés pouvaient induire l'expansion clonale des cellules T naïves. Ces molécules ont comme ligand le CD28, exprimé chez les cellules T naïves (Lipscomb et Masten, 2002). Ces molécules sont des protéines de surface exprimées à la surface en réponse à l'activation via les TLRs (discuté ultérieurement). La liaison du CD28 avec les molécules CD80/CD86 joue un rôle de co-stimulation dans l'expansion clonale des cellules T CD4⁺ naïves (McAdam et al., 2001). Ainsi, le lymphocyte T qui reçoit les deux signaux, soit celui transmis par le récepteur T spécifique qui reconnaît le complexe CMH/peptide et celui des molécules de co-stimulation, est activé. Si les molécules de co-stimulation ne sont pas impliquées, la stimulation du lymphocyte T CD4⁺ naïf par son récepteur à l'antigène conduira à l'anergie plutôt qu'à son activation.

b) La famille du TNF

Le CD40 est un membre de la superfamille des récepteurs au TNF et est exprimé à un niveau basal sur toutes les CD. Suivant l'activation et la maturation des CD, l'expression du CD40 augmente significativement et va s'associer avec le ligand CD40L, exprimé par les cellules T CD4⁺ activées. L'expression du CD40L est régulée par la reconnaissance du complexe CMH/Ag des CD par le TcR et par l'interaction avec les molécules de co-stimulation (CD80/CD86) via le CD28. Le CD40 joue un rôle important dans l'interaction entre les CD et les cellules T puisqu'il a été noté chez les souris CD40/CD40L^{-/-} une perturbation de l'activation des cellules T CD4⁺ naïves (van Kooten et Banchereau, 2000). L'association entre le récepteur CD40 et le CD40L amplifie aussi la libération d'IL-12 par les CD. Cette liaison favorise la sécrétion d'autres cytokines, telles que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10 (van Kooten et Banchereau, 2000) et permet aux CD de devenir des CPA dites immunocompétentes, par une augmentation de l'expression des molécules CD80 et CD86. Une sécrétion soutenue d'IL-12 et une augmentation de l'expression des

molécules de co-stimulation, suivant la liaison CD40/CD40L, sont essentielles à l'activation des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (Cella et al., 1999; Prilliman et al., 2002; Schoenberger et al., 1998). Toutefois, l'équipe de Bourgeois et al. a contredit ce concept, en démontrant que les cellules T CD4⁺ pouvaient induire la différenciation des cellules T CD8⁺ en cellules mémoires et ce, en présence de CPA n'exprimant pas le CD40 (Bourgeois, Rocha et Tanchot, 2002). Ils ont démontré que les cellules T CD8⁺ exprimaient transitoirement le CD40 après leur activation, permettant ainsi l'activation d'une réponse spécifique lymphocytaire T cytotoxique (CTL – *cytotoxic T lymphocyte*).

Le ligand OX40L, qui est exprimé par les CD, fait également partie de la famille du récepteur à TNF. Il a pour ligand le récepteur OX40 exprimé par les cellules T. Dans un état de quiescence, les CD n'expriment pas l'OX40L. Son expression est augmentée suite à l'interaction CD40/CD40L (Ohshima et al., 1997). L'utilisation de souris déficientes en la molécule OX40 ou OX40L a démontré que ces molécules jouaient un rôle important dans l'activation des cellules T, plus précisément au niveau de la production d'IFN- γ chez les cellules T CD4⁺ (Chen et al., 1999; Kopf et al., 1999). L'interaction entre OX40 et OX40L est aussi impliquée dans l'induction d'une réponse de type Th2 (Ohshima et al., 1998). Il a démontré que la co-stimulation des cellules T naïves avec une lignée cellulaire transfectée avec OX40L augmentait l'expression de l'IL-4, favorisant une réponse de type Th2 (Ohshima et al., 1998).

c) Autres molécules de co-stimulation

Le troisième groupe hétérogène de molécules de co-stimulation comprend le *leukocyte function antigen-1* (LFA-1) qui interagit avec ICAM-1 (CD154). Cette liaison accentue l'interaction entre les CD et les cellules T CD4⁺. Il a été démontré que l'inhibition de cette liaison diminue drastiquement la prolifération des cellules T stimulées par les CD (Bachmann et al., 1997). L'interaction entre LFA-1 et ICAM-1 ou ICAM-2 favorise également une réponse de type Th1.

2.4 RÔLE DES CELLULES DENDRITIQUES DANS LE SYSTÈME IMMUNITAIRE INNÉ

Les CD_s peuvent interagir avec les cellules de l'immunité innée. Les principales données concernent leurs interactions avec les cellules NK. L'équipe de Fernandez a montré qu'*in vitro*, un contact cellule-cellule, permet aux CD_s de déclencher l'activité cytotoxique des cellules NK naïves et la production d'IFN- γ (Fernandez et al., 1999). La production de cytokines, telles que l'IL-12, l'IL-15, l'IL-18 et l'IFN de type I par les CD_s activées, stimule la production d'IFN- γ et la fonction cytotoxique des cellules NK (Walzer et al., 2005). La majorité des études portent sur l'implication des CD_s myéloïdes au niveau des cellules NK. Toutefois, il a été observé que les pDCs influencent également la force, la durée et la qualité de l'activation des cellules NK via la production de cytokines (IFN- α) (Della Chiesa et al., 2006). La stimulation des pDCs, via leurs TLRs, initie le recrutement de cellules T et de cellules NK via la production de chimiokines telle que CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10 et CXCL8 (IL-8) (Megjugorac et al., 2004). Chez l'humain, il a été observé que les CD_s dermales et les cellules de Langerhans peuvent activer les cellules NK en présence d'IL-2 exogène et d'IL-12 (Munz et al., 2005).

Les CD_s peuvent aussi interagir avec les cellules T $\gamma\delta$. Ce contact cellulaire permet l'activation des cellules T $\gamma\delta$, observée par une augmentation de l'expression de la molécule CD69, et la production d'IFN- γ et de TNF- α (Conti et al., 2005). Ainsi, les CD_s sont essentielles dans l'activation et la coordination de l'immunité innée et acquise afin de préserver l'intégrité de l'organisme vis-à-vis des attaques extérieures.

2.5 RÔLE DES CELLULES DENDRITIQUES DANS LE SYSTÈME IMMUNITAIRE ACQUIS

L'existence de sous-populations de CD_s présentes dans divers compartiments de l'organisme fait que ces cellules ont un rôle essentiel dans l'établissement de la réponse immunitaire acquise des lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ et des lymphocytes B.

2.5.1 Les cellules dendritiques et les lymphocytes T CD4⁺

De nombreuses expériences réalisées *in vitro* et *in vivo* indiquent que les CD_s jouent un rôle déterminant dans l'initiation des réponses immunitaires grâce, notamment, à leur capacité à activer les lymphocytes T naïfs. Tel que mentionné, cette activation exige l'interaction de deux signaux. Les CD_s peuvent donc activer les T CD4⁺ naïfs et induire leur différenciation en cellules T_H vers une réponse spécifique de type Th1, Th2 ou Th17 (Kaiko et al., 2008). De nombreux facteurs influencent la balance Th1/Th2/Th17 dont l'origine des CD_s, la dose d'Ag, la durée de la stimulation des CD_s et des cellules T, les cytokines produites dans le milieu environnant et le niveau de maturation des CD_s.

2.5.1.1 Initiation d'une réponse Th1

L'un des facteurs les mieux caractérisés dans la différenciation d'une réponse Th1 est la production d'IL-12 et d'IFN de type I (IFN- α et IFN- β) par les CD_s, qui polarise le développement des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T auxiliaire de type 1 (Farrar, Asnagli et Murphy, 2002). L'IL-12 est un hétérodimère formé d'une chaîne légère de 35 kDa (p35) et d'une chaîne lourde de 40 kDa (p40). La sous-unité de 40 kDa est exprimée exclusivement chez les CD_s, les MAC et les monocytes (Zhang et Wang, 2008). La production et la sécrétion d'IL-12 dans le milieu environnant requiert avant tout des modifications post-traductionnelles et la dimérisation des deux sous-unités p35 et p40. L'IL-23 et l'IL-27 sont deux autres cytokines hétérodimères nouvellement identifiées, présentant des similarités avec l'IL-12. Une stimulation des TLRs chez les CD_s est essentielle à la génération d'IL-12. Ainsi, il a été démontré que la liaison de ligands spécifiques aux TLR-3, -4, -7, ou -9 exprimés à la surface des CD_s immatures, induit une production accrue d'IL-12 (voir section sur les TLRs) (Visintin et al., 2001). Cette sécrétion d'IL-12 est d'autant plus amplifiée lorsqu'il y a interaction entre le CD40 et le CD40L des cellules T CD4⁺. Ainsi, l'IL-12 est importante non seulement dans l'initiation de la réponse immunitaire spécifique mais également dans la maintenance de la réaction immunitaire.

La capacité des CD_s à sécréter de l'IL-12 peut être liée à leur origine (lymphoïde versus myéloïde ou encore CD8 α^+ versus CD8 α^-) ainsi qu'à l'expression de différents

TLRs. Chez la souris, les CD $8\alpha^+$ sont les cellules produisant de grandes quantités d'IL-12 en réponse à une stimulation aux LPS ou suivant la liaison CD40/CD40L (Reis et al., 1997). Cette sécrétion d'IL-12 a pour effet d'induire la production d'IFN- γ chez les cellules T activées et donc l'activation d'une réponse Th1. À l'opposé, les cellules T CD4 $^+$ activées par les CD $8\alpha^-$ produisent de l'IL-4 et de l'IL-5, cytokines de la réponse de type Th2 (Brasel et al., 2000; Maldonado-Lopez et al., 1999b). En présence d'IL-10 seules les CD $8\alpha^-$ pouvaient initier une réponse de type Th2 chez les cellules T. Ainsi, les MAC présents dans le milieu environnant des CD $8\alpha^-$ produiraient de l'IL-10 engendrant la production d'IL-10 par les CD $8\alpha^-$ et l'initiation d'une réponse de type Th2 (Boonstra et al., 2006). Il a été démontré que les CD $8\alpha^-$ pouvaient également produire de l'IL-12, mais à des niveaux nettement inférieurs à ceux observés chez les CD $8\alpha^+$. Ainsi, les sous-populations de CD $8\alpha^+$ et CD $8\alpha^-$, jouent un rôle distinct dans la régulation de la réponse immunitaire. L'équipe de Moser et al. a également démontré *in vivo* que les CD $8\alpha^-$ lymphoïdes, pré-incubées avec un antigène soluble, induisent l'activation des cellules T Th1 alors que les CD $8\alpha^-$ myéloïdes induisent une polarisation de type Th2 (Maldonado-Lopez et al., 1999a). Aucune différence n'a été observée entre les FLDCs CD24^{high} (équivalentes aux cCD $8\alpha^+$) et les FLDCs CD11b^{high} (équivalentes aux cCD $8\alpha^-$) quant à leur capacité à produire de l'IL-12 suivant une stimulation via leurs TLRs (Naik et al., 2005). Pour ce qui est des pCDs, celles-ci ne peuvent pas produire de l'IL-12 après une stimulation via leurs TLRs (Ito et al., 2006b). Bien que les pDCs ne produisent pas directement cette cytokine, la synthèse d'IFN de type I produite par les pDCs augmente la production d'IL-12 chez les mCDs (Ito et al., 2006b). Ces études ont donc permis de confirmer que les sous-populations de CD 8α ont un rôle défini et distinct dans la réponse immunitaire.

2.5.1.2 Initiation d'une réponse Th2

La différenciation des cellules Th naïves en cellules effectrices de type Th2 implique l'action des cytokines IL-4, IL-6, IL-10 et IL-11. L'origine d'IL-4 n'a pas encore été élucidée et semblerait provenir des cellules TNK, des éosinophiles ou encore des mastocytes. Toutefois, il a clairement été établi que les CD 8α sont incapables de produire cette dernière. L'activation d'une réponse de type Th2 par les CD 8α pourrait

se faire via la sécrétion d'IL-6 qui favorise la production d'IL-4 et inhibe la phosphorylation de STAT1 et l'expression du gène IFN- γ (Detournay et al., 2005; Dodge et al., 2003). Il a été observé que seul les ICDs et les CD pulmonaires produisent de l'IL-6 suite à leur activation. Cependant, il a été noté que la sécrétion d'IL-10 par les CD favorise une réponse de type Th2 via une inhibition de la synthèse d'IL-12. En présence de certains pathogènes, telles que *Bordetella pertussis* ou de la Toxine du Cholera, les CD produisent de l'IL-10 favorisant l'activation des cellules T_{reg} de type 1 qui inhiberont l'activation de cellules T_H spécifiques (McGuirk, McCann et Mills, 2002; Lavelle et al., 2003). Ces dernières études s'entendent pour dire que la production d'IL-10 est souvent associée à un état dit immature chez les CD. Ce phénotype immature s'apparente à celui observé lorsqu'il y a induction de la tolérance aux endotoxines chez les CD. De plus, plusieurs études ont observé que la production d'IL-10 chez les CD est dépendante de l'activation de l'ERK1/2 MAPK (Yanagawa et Onoe, 2007; Dowling, Hamilton et O'Neill, 2008; McGuirk, McCann et Mills, 2002; Qian et al., 2006). Ainsi, un changement phénotypique des CD favorisent un changement dans la polarisation de la réponse Th.

2.5.1.3 Initiation d'une réponse Th17

Depuis plusieurs années il a été établi que les cellules CD4⁺ pouvaient également initier une réponse de type Th17, impliquée dans l'apparition de maladies auto-immunitaires (Nakae et al., 2003) ou lors d'une réponse immunitaire contre des pathogènes extracellulaires (Harrington et al., 2005). La réponse de type Th17 a été découverte suite à l'identification de la cytokine IL-23, une cytokine membre de la famille de l'IL-12. Les cellules qui sont en majeure partie responsable de la production d'IL-23 sont les CD présentes dans les tissus périphériques, tels que la peau, la muqueuse intestinale et les poumons (McKenzie, Kastelein et Cua, 2006). La sécrétion d'IL-23 est stimulée via l'activation des TLRs en présence de LPS, de peptidoglycanes ou d'ADN bactériens contenant de motifs riches en CpG. L'interaction entre les ligands et leurs récepteurs augmente l'expression de la chaîne p40 et p19 chez les CD et la libération d'IL-23 (Kastelein, Hunter et Cua, 2007). Il semblerait que la production d'IL-23 serait préférentiellement induite suivant l'activation du TLR2 chez les CD (Re et Strominger, 2001; Langrish et al., 2004).

D'autre part, le rôle de l'IL-23 dans l'induction d'une réponse de type Th17 reste encore à être élucidé.

2.5.2 Les cellules dendritiques et les lymphocytes T CD8⁺

Les CD^s peuvent activer les lymphocytes T CD8⁺ naïfs avec une efficacité plus faible que pour les CD4⁺ naïfs. La capacité des CD^s à présenter des antigènes via les molécules de classe I du CMH est extrêmement importante pour le déclenchement d'une réponse immune spécifique et cytotoxique. En effet, la plupart des cellules de l'organisme, bien que possédant des molécules CMH I à leur surface, n'expriment pas les molécules de co-stimulation nécessaires pour délivrer le second signal d'activation aux cellules T CD8⁺ naïves. Ainsi, les CD^s activées peuvent présenter des antigènes exogènes par présentation croisée aux cellules T CD8⁺ naïves présents dans les organes lymphoïdes (Bevan, 1976). Tout comme pour les cellules T CD4⁺, les cellules T CD8⁺ nécessitent la reconnaissance des complexes CMH I/peptides et des molécules de co-stimulation à la surface des CD^s (Mescher et al., 2006). Toutefois, des études ont démontré *in vivo* que les lymphocytes T CD4⁺ jouent le rôle du 3^e signal nécessaire à l'activation des cellules T CD8⁺ naïfs. Ainsi, les CD^s doivent recevoir un signal des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires (grâce au système CD40/CD40L) pour devenir compétentes pour la stimulation des lymphocytes CD8⁺ cytotoxiques. Cette association permet, outre une augmentation de la production d'IL-12, une maturation finale des CD^s nécessaire à la stimulation des cellules T CD8⁺ cytotoxiques (Schoenberger et al., 1998). L'activation des cellules T CD8⁺ naïfs nécessitent donc la présence d'IL-12.

2.6 RÔLE DES CELLULES DENDRITIQUES DANS LA TOLÉRANCE AUX ENDOTOXINES

Parallèlement à leur implication dans l'initiation et l'orientation de la réponse immune, les CD^s peuvent également jouer un rôle important dans l'induction de la tolérance aux endotoxines suivie de septicémies (Gautier et al., 2008). Le terme tolérance aux endotoxines a été défini comme étant le phénomène où le système immunitaire ne

répond plus adéquatement à une stimulation aux LPS, suivant des expositions répétées. Une tolérance croisée, qui consiste à induire une tolérance par l'utilisation de LPS et d'autres ligands spécifiques aux TLRs, a également été démontrée à partir de modèles expérimentaux (Dobrovolskaia et al., 2003; Fitting, Dhawan et Cavaillon, 2004). Cette paralysie immunitaire systémique précoce et prolongée fait souvent suite au SRIS initial. Elle a été mise en évidence chez les patients septiques et chez les patients ayant subi une première phase SRIS sans infection secondaire. Chez ces patients, cette perturbation du système immunitaire a été définie selon trois caractéristiques : (i) une diminution de la capacité des monocytes à présenter l'Ag traduite par une diminution de l'expression membranaire d'HLA-DR (Ditschkowski et al., 1999), (ii) une diminution des capacités leucocytaires à synthétiser et à produire des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8) en réponse à une stimulation aux LPS (Cavaillon, 2001, *J Leukoc Biol*, 70 :30-38) et (iii) une hausse des concentrations plasmatiques de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-1Ra) (Ertel et al., 1995). La majorité des études portant sur les mécanismes d'induction de tolérance a été faite chez les monocytes/MAC (Cavaillon et Adib-Conquy, 2006). Ces études ont permis de démontrer que le phénomène de tolérance aux endotoxines résultait d'une reprogrammation des monocytes/MAC vers un phénotype anti-inflammatoire, plutôt qu'une inhibition globale de leur activation. Outre les monocytes/MAC, d'autres cellules du système immunitaire peuvent exhiber un phénotype de tolérance aux endotoxines.

Des études ont démontré que l'induction de tolérance pouvait également induire des changements fonctionnels chez les CD_s (Karp et al., 1998; Reis et al., 1999). Des expositions répétées aux LPS ont eu pour effet de diminuer la production d'IL-12 chez des CD_s humaines devenues tolérantes (Karp et al., 1998). De plus, une activation prolongée des CD_s favorisait une réponse de type Th₂, notée par une diminution de la production d'INF- γ et une augmentation d'IL-4 chez les cellules T CD₄⁺ stimulées (Langenkamp et al., 2000b). Récemment, une étude portant sur les GMDCs *in vitro*, a démontré une diminution de l'activité de la p38 MAPK et de la production d'IL-12p40, après une activation répétée en présence de LPS (Yanagawa et Onoe, 2007). De plus, les GMDCs devenues tolérantes synthétisent davantage la cytokine anti-

inflammatoire IL-10, conséquence d'une augmentation de l'activité de la MAPK ERK1/2 et de la protéine TRAF3. Ce changement au niveau des cytokines synthétisées par les CD enclenche soit un état d'anergie des cellules T, un changement de réponse Th1 vers une réponse Th2 ou l'augmentation de la réponse des lymphocytes T_{reg} (Efron et Moldawer, 2003). L'état tolérant des CD peut être aussi soutenu par la présence de TGF- β (Mou et al., 2004) ou par la présence de facteurs immunosuppresseurs tels que les glucocorticoïdes (dexaméthasone) (Bosma et al., 2008). Ainsi, les CD humaines devenues tolérogéniques en présence de dexaméthasone, ne peuvent augmenter l'expression des molécules de co-stimulation (CD83, CD86) et demeurent dans un état immature suite à une stimulation aux LPS (Bosma et al., 2008). Ce phénomène de tolérance aux LPS, est associé également à une hausse de production d'IL-10 causant une inhibition de l'activation des cellules T vers une réponse de type Th1. Une étude récente, faite chez le modèle murin de choc hémorragique, a noté de profondes perturbations chez les CD isolées de la rate dont une baisse de l'expression du récepteur TLR4/MD-2 et de l'activation des MAP kinases suite à une stimulation *ex vivo* aux LPS (Kawasaki et al., 2008b). Cette étude suggère que cet état de non activation s'apparente à celui observé lors de l'induction de la tolérance aux endotoxines et explique en partie l'apparition d'un état d'immunosuppression en période post-trauma (Kawasaki et al., 2008b).

Les études portant sur la tolérance aux endotoxines chez les monocytes/MAC ont démontré un lien de causalité entre l'expression de régulateurs négatifs de la voie d'activation intracellulaire des TLRs et la diminution de cytokines pro-inflammatoires (discuté dans la section sur les TLRs). Néanmoins, les mécanismes responsables de l'apparition de tolérance aux endotoxines chez les CD sont encore très peu connus.

3. LES RÉCEPTEURS «TOLL-LIKE RECEPTOR»

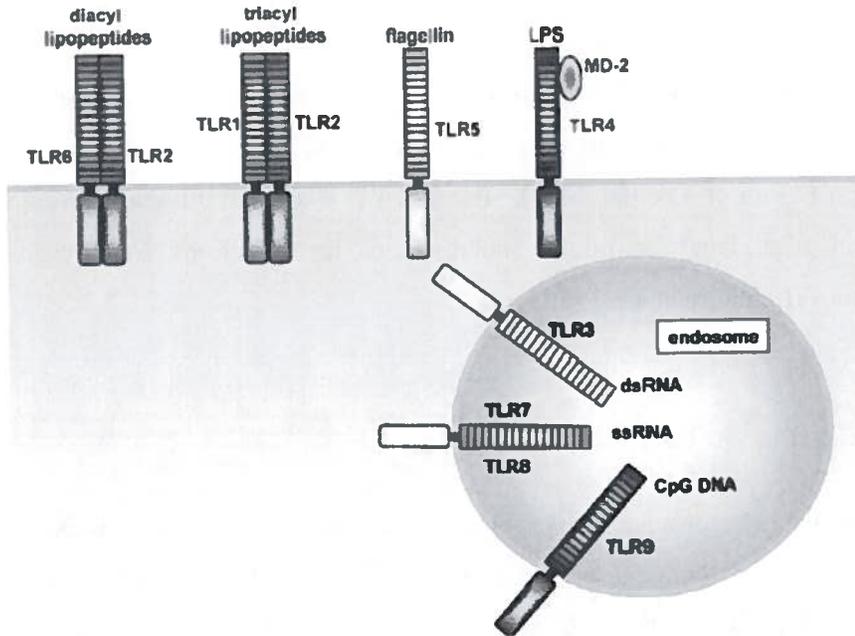
Le premier membre de la famille des TLRs a été identifié chez la drosophile en tant qu'élément du complexe de signalisation qui contrôle la polarisation dorso-ventrale de l'embryon (Akira et Takeda, 2004). Par la suite, il a été établi que le récepteur Toll jouait un rôle dans l'immunité innée contre les infections fongiques chez les drosophiles (Lemaitre et al., 1996).

3.1 STRUCTURE DU TOLL-LIKE RECEPTOR

Les TLRs sont des protéines membranaires de type I dont le domaine extracellulaire de la protéine toll contient plusieurs motifs riches en leucine (LRR : *leucine-rich repeats*) (Medzhitov, 2001). Chaque motif consiste 24 à 29 acides aminés et une séquence riche en leucine formant ainsi la partie adhésive des molécules de la surface cellulaire. Grâce à cette structure unique des TLRs, ceux-ci ont la capacité de reconnaître différents ligands spécifiques. Les TLRs possèdent également une séquence d'environ 200 acides aminés au niveau de leur segment cytoplasmique que l'on appelle le domaine Toll/IL-1R (TIR), commune aux récepteurs de l'IL-1. On retrouve 3 boîtes conservatrices, boîte 1, 2 et 3, dans le domaine TIR qui jouent un rôle important dans la voie de signalisation et le recrutement de molécules adaptatrices (Akira et Takeda, 2004).

3.2 LA FAMILLE DES RÉCEPTEURS TLRs

À l'heure actuelle, 13 membres de cette famille de récepteurs ont été identifiées chez les mammifères (Akira et Takeda, 2004). Chez l'humain on retrouve les TLR1 à TLR10 (mais pas le TLR11) alors que chez la souris, seul le TLR10 n'est pas exprimé. Les TLRs apparaissent sous la forme de dimères. Alors que la plupart des TLRs sont des homodimères, le TLR2 a la particularité de s'associer en hétérodimère avec le TLR1 ou le TLR6 (**Figure 6**).



(Figure tirée de Takeda *et al.*, 2005)

Figure 6 : Famille des Toll-like receptors. Les TLR1, 2, 4, 5, 6 sont exprimés à la surface des cellules et reconnaissent des motifs spécifiques de pathogènes ou des signaux de danger (HSP), qui une fois liés engendrent l'activation des cellules cibles. Les TLR3, 7, 8 et 9 sont des récepteurs exprimés intracellulairement au niveau de l'endosome/lysosome et sont impliqués dans la reconnaissance de séquences d'acides nucléiques.

Chaque type de TLRs peut se lier sélectivement à un type de ligands (**Tableau 1**), ce qui permet d'activer spécifiquement les cellules-cibles.

Récepteur TLR	Ligands microbiens	Ligands endogènes	Autres	Types de CD exprimant le TLR
TLR-1 (+ TLR-2)	Lipoprotéines			mCDs, cCDs (CD8 ⁺ et CD8 ⁻)
TLR-2	Lipoprotéines/Diacyl-lipopeptides (LTA); peptidoglycane des bactéries Gram ⁺ ; acide lipotéichoïde; champignons, glycoprotéines virales	HSP70		mCDs, cCDs (CD8 ⁺ et CD8 ⁻), GMDCs,
TLR-3	ARN double brin		Poly [I:C]	mCDs, cCDs (CD8 ⁺ et CD8 ⁻), FLDCs,
TLR4	LPS (bactéries Gram ⁻), glycoprotéines virales, (LA), fibrinogène	HSP60, HSP70, domaine de la fibronectine, acide hyaluronique, héparine sulfate		mCDs, cCDs (CD8 ⁺ et CD8 ⁻), FLDCs, GMDCs

Récepteur TLR	Ligands microbiens	Ligands endogènes	Autres	Types de CD exprimant le TLR
TLR-5	Flagelline (bactéries)			mCDs, GMDCs
TLR-6 (+TLR-2)	Diacyl-lipopeptides (LTA)			mCDs, cCDs (CD8 ⁺ et CD8 ⁺), GMDCs
TLR-7	ARN simple brin		Drogues (imidazoquinoline, laxoribine, bropirimine)	pCDs, FLDCs
TLR-8	ARN simple brin		Imidazoquinoline	mCDs, cCDs (CD8 ⁺ et CD8 ⁺)
TLR-9	ADN CpG non-méthylés	Complexes auto-anticorps/ADN génomique		pCDs, cCDs (CD8 ⁺ et CD8 ⁺), FLDCs, GMDCs
TLR-10	Inconnu			
TLR-11	Profiline			
TLR-12	Inconnu			
TLR-13	Inconnu			

Tableau I : Agonistes des TLRs et sous-populations de CD exprimant ces récepteurs

Les TLRs sont des récepteurs essentiels dans la reconnaissance d'agents pathogènes et de signaux de danger produits lors d'une pathologie, d'un stress ou d'un traumatisme. Ceci est la base du modèle immunitaire de danger suggéré par Polly Matzinger (Matzinger, 2002). Elle suggère que des signatures moléculaires sont reconnues et s'associent à des TLRs mettant ainsi le système immunitaire en alerte.

3.3 LE TLR4

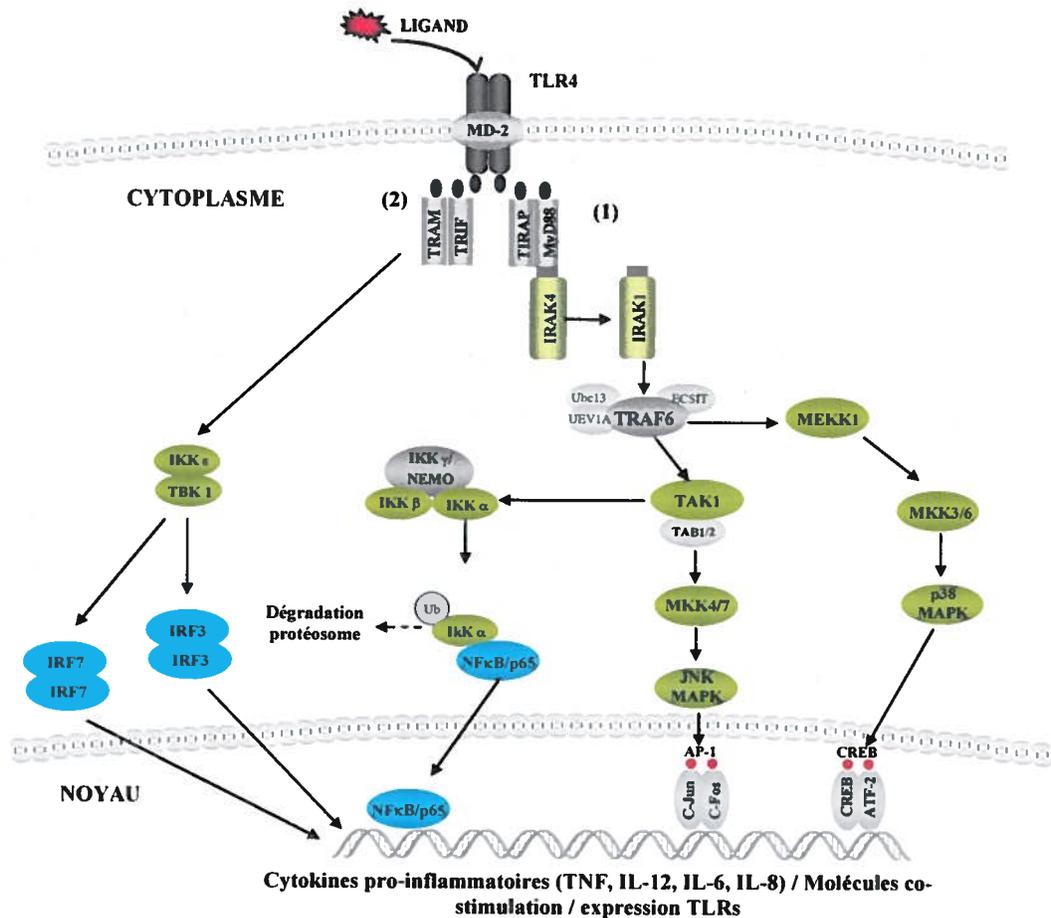
Le LPS ou endotoxine est une protéine constitutive de la paroi des bacilles Gram-négatif qui est connue pour jouer un rôle prépondérant dans l'apparition et le développement d'un état de choc lors d'infections à ces bactéries. Le LPS est couramment utilisé dans les modèles expérimentaux de choc septique (endotoxinique) car son injection reproduit l'ensemble des signes cliniques et conséquences biologiques observés au cours de ce type de choc : fièvre, hypotension, lésions tissulaires et défaillances d'organes. Lorsque le LPS est libéré dans l'organisme, il peut se fixer sur une protéine synthétisée par le foie : la LBP (*LPS Binding Protein*), qui permet sa présentation à un récepteur membranaire, le CD14 (Haziot et al., 1995). Néanmoins, malgré l'importance prouvée de ces deux protéines dans la reconnaissance et la présentation du LPS, aucune d'entre elles n'a d'action directe sur la signalisation intracellulaire induite par le LPS. L'étude génétique de deux lignées murines naturellement résistantes au choc endotoxinique (les souris C3H/HeJ et

C57BL10/ScCR) a permis d'élucider le mécanisme par lequel se fait la transduction du signal lorsque le récepteur CD14 se trouve en présence de LPS (Beutler, 2000). Chez ces souris, le gène défectueux a été localisé au niveau du chromosome 4 et identifié comme étant le TLR4. Les mutations responsables de la résistance aux LPS ont été caractérisées : les souris C3H/HeJ contiennent une mutation ponctuelle (proline → histidine) dans le domaine TIR de TLR4 responsable de la synthèse d'un récepteur inactif ; les souris C57BL10/ScCR présentent une mutation non-sens qui bloque totalement l'expression de TLR4 (Poltorak et al., 1998). Ainsi l'absence ou l'inactivation de TLR4 supprime totalement la sensibilité aux LPS. Néanmoins, si la présence de TLR4 est nécessaire pour induire un signal cellulaire, elle n'est pas suffisante. La transfection du gène *tlr4*, dans des cellules qui ne l'expriment pas naturellement, ne restaure pas la réponse aux LPS. Une deuxième protéine appelée MD2 est nécessaire. Ainsi lorsque le gène de MD2 est co-transfecté avec celui de TLR4, les cellules deviennent totalement réactives à l'endotoxine (Shimazu et al., 1999).

Probablement plus qu'aucun autre membre de la famille, le TLR4 est à la croisée des phénomènes inflammatoires d'origine infectieuse ou non, car il est stimuable aussi bien par le LPS d'origine microbienne que par des molécules endogènes de danger tels l'acide hyaluronique, le sulfate d'héparine, le fibrinogène, la HMGB1 et les HSP. De plus, le TLR4 est impliqué dans les défaillances immunitaires suivant un traumatisme sévère. Ainsi, l'état d'immunosuppression était plus sévère et plus soutenu chez des souris C3H/HeJ soumises à une brûlure sévère par rapport aux souris exprimant un TLR4 fonctionnel (C3H/HeN). En effet, les souris C3H/HeJ présentaient une inhibition soutenue de la réponse des cellules T et une hausse de l'agression oxydante (Jobin, Garrel et Bernier, 2000). De part ces faits, le TLR4 semble être un récepteur clé dans l'immunomodulation suivant une brûlure sévère.

3.3.1 LA CASCADE DE SIGNALISATION DU TLR4

La voie de signalisation *via* les molécules TLRs a fait l'objet de plusieurs études depuis les dernières années. Globalement, deux voies de signalisation ont été identifiées : la voie MyD88 dépendante et la voie MyD88 indépendante (Figure 7).



(Figure adaptée de Medzhitov, 2001)

Figure 7 : Schéma de la voie de signalisation de TLRs MyD-88-dépendante et MyD88-indépendante. La fixation du ligand sur le TLR entraîne le recrutement de MyD88 via une interaction TIR-TIR à la membrane cytoplasmique. (1) De façon concomitante, la formation du complexe IRAK-1 permet à celui-ci de se fixer à MyD88 via son domaine de mort (DD). Grâce à l'interaction IRAK-1/IRAK-4, IRAK-4 peut phosphoryler IRAK-1, entraînant son activation. TRAF-6 va interagir de façon transitoire avec le complexe par l'intermédiaire de la forme activée d'IRAK-1. Le complexe phospho-IRAK-1/TRAF-6 se détache du complexe récepteur pour ensuite interagir avec le complexe membranaire constitué par TAK1, TAB1 et TAB2, entraînant leur phosphorylation et leur translocation dans le cytosol. IRAK-1 reste au niveau membranaire où elle va être dégradée. Une fois activée, TAK-1 phosphoryle le complexe IKK et certaines MAP kinases spécifiques. IKK dégrade l'inhibiteur I-κB de NF-κB en le phosphorylant. NF-κB ainsi libéré, migre dans le noyau où il va interagir avec des promoteurs spécifiques des gènes cibles (TNF-α, IL-12). Les MKKs activées vont à leur tour activer des MAP kinases de la famille JNK/P38 conduisant à l'activation d'autres facteurs transcriptionnels tel que *c-jun* et *c-fos*. (2) L'association du ligand à son TLR peut également initier le recrutement d'autres protéines, telle que TIRAP, TRIF, TRAM. Ces dernières sont impliquées dans la régulation de l'IFN de type chez les CD4.

3.3.1.1 Voie MyD88 dépendante

Toutes les molécules TLRs, à l'exception de la molécule TLR3, empruntent une voie de signalisation impliquant la molécule cytoplasmique MyD88 qui contient un domaine TIR et un « domaine de mort » (DD). Cet adaptateur cytoplasmique a été isolée à l'origine chez les cellules myéloleucémiques M1 permettant de caractériser son implication dans la différenciation de ces cellules en MAC (Lord, Hoffman-Liebermann et Liebermann, 1990). Après la liaison d'un ligand à un TLR, la molécule MyD88 induit le recrutement et l'activation des kinases IRAK (IRAK1, IRAK2, IRAK4 et IRAK-M) via les domaines DD. IRAK 1 et IRAK4 possèdent une activité kinase intrinsèque alors qu'IRAK2 et IRAK-M n'en possèdent pas. Suivant une stimulation des TLRs, la molécule MyD88 recrute IRAK4 qui initie la phosphorylation d'IRAK1. Cette phosphorylation a pour effet d'induire l'activité kinase d'IRAK1 qui à son tour permet le recrutement et l'activation de la molécule TRAF6 (Akira et Takeda, 2004). Cette molécule à domaine RING active alors les facteurs Uev1a et Ubc13 qui catalysent la polyubiquitination de TRAF6. Cette polyubiquitination permet de se détacher du complexe récepteur et interagir avec des protéines adaptatrices telles que TAK1, TAB1 et TAB2 ou TAB3, au niveau la membrane plasmique. Ainsi, l'interaction entre TRAF-6/IRAK1 et ces molécules induit la phosphorylation de TAB2/TAB3 et TAK1 et la translocation du complexe TRAF6/TAK1/TAB2/TAB3 dans le cytoplasme. Par la suite, TAK1 est activé dans le cytoplasme enclenchant l'activation du complexe des kinases I κ B (IKK), IKK- α IKK- β et la sous-unité régulatrice IKK- γ (Takaesu et al., 2003). L'inhibiteur cytoplasmique de NF- κ B, I κ B est phosphorylé par IKK- γ , permettant ainsi la libération du facteur de transcription et de sa translocation nucléaire. La protéine adaptatrice TAK1 phosphoryle également la kinase MKK6, qui à son tour, induit la phosphorylation des MAPK p38, JNK et l'activation du facteur de transcription AP-1. Des études utilisant des souris déficientes pour le gène codant MyD88 ont confirmé que ce facteur joue un rôle essentiel dans l'induction NF- κ B-dépendant des gènes codant pour le TNF- α et l'IL-6 (Takeda, Kaisho et Akira, 2003).

3.3.1.2 Voie MyD88-indépendante

L'analyse de souris déficientes pour la molécule MyD88 a également révélé l'existence d'une voie de signalisation indépendante de MyD88 en aval de certains TLRs. Outre la molécule adaptatrice MyD88, on retrouve 3 autres molécules dont le TIRAP (*TIR-domain-containing adaptor protein* ou MAL : MyD88-adaptor-like protein), TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β*) et TRAM (*TRIF-related adaptor molecule* ou TICAM2 : *TIR-domain-containing molecule 2*) (Akira et Takeda, 2004).

a) Voie de TIRAP

Une autre molécule cytoplasmique à domaine TIR est impliquée dans la signalisation par certains TLRs. La protéine TIRAP ou MAL fonctionne comme cofacteur pour MyD88 en aval de TLR3 et TLR4, mais pas pour les autres TLRs. Contrairement à MyD88, TIRAP ne contient pas de domaine de mort (Fitzgerald et al., 2001), mais contient un domaine de liaison 4, 5-biphosphate (PIP2) qui permet le recrutement de TIRAP au niveau des membranes lors de l'activation du TLR4. Ainsi, la fonction primaire de TIRAP est de contrôler le recrutement de MyD88 au niveau du récepteur TLR4 (Horng, Barton et Medzhitov, 2001).

b) Voie de TRIF

Il a été démontré que l'induction de NF- κ B et AP-1 par le LPS (TLR4) et les ARN double brin (TLR3), n'étaient pas abolies chez les souris MyD88^{-/-} mais seulement retardée (Kawai et al., 1999). Les récepteurs TLR4 (en plus de la signalisation *via* MyD88) et TLR3 induisent l'activation d'une autre molécule à domaine TIR, connue sous le nom de TRIF ou TICAM-1 (*TIR-domain-containing molecule 1*), qui activera à son tour NF- κ B et AP1 et le facteur de transcription IRF3 (Yoneyama et al., 1998). IRF3 est exprimé de façon constitutive dans les cellules et suivant une infection virale, son domaine régulateur C-terminal est activé par phosphorylation permettant ainsi la formation de dimères IRF3. Suivant la dimérisation, IRF3 est transporté dans le noyau activant la transcription des gènes d'IFN de type I (IFN β) via le recrutement de co-activateurs dont p300 et CBP (*cAMP-responsive-element-binding-protein (CREB)-*

binding protein) (Taniguchi et Takaoka, 2002). Chez les MAC et les CDs, une stimulation aux LPS induit la production d'IFN- β via une activation de la voie MyD88-indépendante (Kawai et al., 2001).

c) Voie de TRAM

La molécule TRAM fonctionne comme un cofacteur de TRIF en aval de TLR4 et est impliquée dans l'induction des gènes à IFN. Des analyses portant sur des souris déficientes pour la molécule TRAM ont permis de démontrer que TRAM joue un rôle essentiel dans la cascade MyD88-indépendante lors de l'activation du TLR4. Après une stimulation avec un ligand spécifique pour TLR4, ces souris déficientes démontrent une perturbation au niveau de l'activation d'IRF3 et une diminution de l'expression des gènes à IFN (Yamamoto et al., 2003). De plus, la production de cytokines inflammatoires suivant une stimulation aux LPS est diminuée autant chez les souris TRIF^{-/-} que chez les souris TRAM^{-/-}. Ceci indique que TRAM et TRIF sont toutes deux impliquées dans l'induction de la réponse inflammatoire via une stimulation du TLR4.

3.4 LES FONCTIONS BIOLOGIQUES DES TLRs CHEZ LES CDs

Les multiples protéines de signalisation permettent aux récepteurs TLRs d'activer différents gènes grâce auxquels la réaction cellulaire des CDs s'accorde au type d'agent pathogène rencontré. L'invasion des tissus par un agent pathogène déclenche une réaction inflammatoire locale se traduisant notamment par la sécrétion d'une CC-chimiokine appelée la CCL19 (MIP-3 α - *macrophage inflammatory protein 3 alpha*) et par l'expression de sélectine E (CD62E) sur les cellules endothéliales (Dieu-Nosjean et al., 2000). Les précurseurs des CDs et des cellules de Langerhans expriment le CCR6 (Charbonnier et al., 1999) étant le récepteur de la chimiokine CCL19, ainsi que CLA, un ligand de CD62E. Grâce à ces molécules de surface, les précurseurs des CDs sont d'abord attirés puis retenus sur le site d'inflammation. Il a été démontré que les CDs activées aux sites inflammatoires sécrètent également des chimiokines telles que la CCL3 (MIP-1 α), CCL4, CCL2 (MCP-1), KC et CXCL10

(IP-10) (Dearman et al., 2008b). Ces chimiokines se lient à la surface luminale de l'endothélium vasculaire et induit le recrutement et l'activation d'autres leucocytes vers les sites inflammatoires. La présence de ligands des TLRs et/ou de stimuli inflammatoires tels que l'IL1- β ou le TNF- α , va permettre la maturation des CD8. Cette maturation enclenche rapidement une diminution de l'expression du récepteur CCR6 et une augmentation du CCR7, dont les ligands CCL19 et la chimiokine CCL21 (6Ckine) sont exprimés dans les zones T des organes lymphoïdes secondaires (Dieu et al., 1998). Ces phénomènes simultanés permettent aux CD8 de quitter le site inflammatoire et d'être attirées vers les organes lymphoïdes où elles vont activer des lymphocytes spécifiques du pathogène.

Quel que soit le type de TLR activé, il est clairement établi qu'il s'en suit une augmentation des molécules de co-stimulation (CD80, CD86 et CD40) à la surface des CD8 (Kawai et al., 1999). L'augmentation des molécules de co-stimulation est dépendante de l'expression des TLRs, mais pas du recrutement de la protéine adaptatrice MyD88 (Kaisho et al., 2001). Ainsi, une hausse de l'expression des molécules CD80, CD86 et CD40 a été observée chez des CD8 isolées de la rate de souris MyD88^{-/-} suivant une stimulation aux LPS. L'expression des molécules de co-stimulation est, entre autre, régulée par l'activation des MAP kinases via l'activation de la voie de signalisation des TLRs. Une inhibition de JNK entraîne une diminution significative de l'expression du CD40, CD86 et CD80 chez les CD8 stimulées aux LPS (TLR4) ou aux peptidoglycanes (TLR2) (Dowling, Hamilton et O'Neill, 2008). Une inhibition de la p38 induit également une diminution du CD40, CD80 mais à moindre niveau. Quant à la voie ERK1/2, une inhibition de celle-ci induit une augmentation du CD40 et une diminution des molécules CD80 et CD86 chez les CD8 stimulées en présence de LPS. L'initiation de la voie de signalisation des TLRs conduit à l'activation des MAP kinases et à l'induction de la maturation des CD8 nécessaire à l'activation spécifique des cellules T. Outre une augmentation des marqueurs de maturation et de la sécrétion de médiateurs inflammatoires des CD8 activées, certains groupes de recherche ont étudié l'impact d'une stimulation via les TLRs sur sa propre expression spécifique. L'équipe d'An et al. a démontré qu'une stimulation aux LPS induisait une augmentation de l'expression de l'ARNm du TLR4 chez les CD8 immatures (An et al., 2002b). Toutefois, peu d'études ont observé une élévation de l'expression de ce récepteur à la surface des CD8 activées.

Au-delà de l'implication des molécules de co-stimulation dans l'activation des cellules T, l'expression du CD40 à la surface des CD joue un rôle dans la production de cytokines immunostimulatrices pro-Th1, telle que l'IL-12. Ainsi, il a été observé que l'interaction entre la molécule CD40 et CD40L des cellules T induit la translocation du facteur de transcription NF- κ B dans le noyau chez les CD. L'interaction libère les différentes sous-unités de NF- κ B, soit p65(RelA) : p50, p52 : RelB et cRel dans le noyau et leur fixation à des séquences spécifiques au niveau du promoteur de gènes cibles. Lors de l'utilisation de souris déficientes pour les sous-unités du NF- κ B, Ouaz et *al.* ont démontré l'importance de la sous-unité p50 : RelA dans le développement des CD et de p50 : c-Rel au niveau de l'expression du gène IL-12p40 suivant une stimulation aux LPS (Ouaz et al., 2002; Zhang et Wang, 2008). La protéine IRF et la cytokine IFN- γ sont également impliquées dans la régulation de la production d'IL-12. En réponse à l'IFN- γ , la protéine IRF se lie au promoteur du gène de l'IL-12p40 et initie sa transcription (Albrecht et al., 2004). La production d'IL-12 chez les CD activées par leurs TLRs, est également régulée par la phosphorylation de la p38. Il a été démontré qu'une inhibition de la p38 chez les CD immatures stimulées aux LPS diminue la production d'IL-12 (Kikuchi et al., 2003). Ainsi, la stimulation des CD avec des LPS ou des CpG résulte à une production d'IL-12 et l'induction d'une réponse de type Th1. Les souris déficientes MyD88^{-/-} ne peuvent initier l'activation des cellules T vers une réponse Th1 mais plutôt vers une réponse Th2 (Kaisho et al., 2002). Outre une production de cytokines pro-Th1, les agonistes des molécules TLRs induisent aussi la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF α), ou anti-inflammatoires (IL-10) ou de NO (Dowling, Hamilton et O'Neill, 2008; Langenkamp et al., 2000a). Les agonistes des récepteurs TLR3, 7 et 9 sont les seules molécules connues pouvant induire l'expression d'IFN de type I qui est impliquée dans l'immunité antivirale. Une fois que les pDCs sont activées via leurs TLR-7 et -9, il y a augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation et du CMH de classe I et II conférant ainsi un phénotype mature. Les pDCs peuvent également synthétiser des cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α et l'IL-6 lors d'une infection virale. La présence de TNF- α favorise la différenciation des pDCs en CD matures alors que l'IL-6, en synergie avec l'IFN- α , favorise la différenciation de cellules productrices d'Ig (Jego et al., 2003a; Fitzgerald-Bocarsly, Dai et Singh, 2008).

3.5 RÉGULATION NÉGATIVE DES RÉCEPTEURS DE TYPE TLRs

Une trop forte activation des TLRs peut être néfaste pour l'organisme et pour cette raison, il existe différents régulateurs négatifs de cette voie. Ces mécanismes de régulation mettront en jeu, la forme soluble de certains TLRs (sTLR4 et sTLR2), la forme courte de la molécule MyD88 (sMyD88s - *short form of MyD88*), IRAK-M, la famille des protéines régulatrices de la transduction du signal des cytokines (SOCS), NOD2, PI3K et TOLLIP. Jusqu'à présent deux formes solubles de TLRs ont été identifiées, soit le sTLR4 et le sTLR2 inhibant l'activation du NF- κ B et la production de TNF- α par les monocytes/MAC (Iwami et al., 2000; LeBouder et al., 2003). Les mécanismes par lesquels les formes solubles inhibent les fonctions du TLR4 et du TLR2 restent à être élucidés. La sMyD88, dont la partie inter domaine est inexistante, est impliquée dans l'inhibition de l'activation du NF- κ B chez les monocytes stimulés en présence de LPS ou d'IL-1 (Janssens et al., 2002). L'expression de sMyD88 est augmentée chez les monocytes stimulés aux LPS et favorise la formation d'hétérodimères sMyD88-MyD88 inhibant le recrutement d'IRAK4 et la phosphorylation d'IRAK-1 (Burns et al., 2003).

Le rôle « charnière » d'IRAK-1 dans la signalisation intracellulaire des récepteurs TLRs/IL1R explique probablement l'existence de systèmes de rétrocontrôle destiné à éviter une activation incontrôlée et délétère. IRAK-M est un membre de la famille IRAK qui a un rôle inhibiteur dans la voie de signalisation TLR/IL1R (Janssens et Beyaert, 2003). Il a été démontré que les souris IRAK-M^{-/-}, présentent une suractivation spontanée ou provoquée des TLRs et une déficience dans l'induction de la tolérance aux LPS. De même, les MAC IRAK-M^{-/-} ont une production significativement plus importante des cytokines pro-inflammatoires en réponse à la stimulation par différents PAMPs (Kobayashi et al., 2002). Il est clair que les MAC au repos contiennent peu ou pas de cette protéine. Suite à une stimulation aux LPS, IRAK-M est rapidement synthétisé en grande quantité et semble bloquer la dissociation du complexe IRAK-1/IRAK-4 de MyD88 inhibant ainsi la formation du complexe IRAK-1/TRAF6. Toutefois, il a été démontré que l'expression de la protéine IRAK-M est spécifique aux MAC et qu'elle n'est pas impliquée dans l'induction de tolérance aux endotoxines chez les CD_{11b} (Janssens et Beyaert, 2003).

TOLLIP est une protéine retrouvée dans le complexe IRAK-1/MyD88 et interagit avec les membres de la superfamille des récepteurs contenant les protéines TIR, incluant le TLR2 et le TLR4 (Zhang et Ghosh, 2002). Son rôle reste encore à être élucidé mais sa surexpression entraîne une diminution de l'activation de NF- κ B induite par l'IL-1. Wald et *al.* ont décrit SIGIRR (*Single ImmunoGlobulin IL1R-Related protein*) et ST2 comme étant des pan-inhibiteurs de la superfamille des récepteurs TLR/IL1R (Wald et al., 2003; Brint et al., 2004). Les souris SIGIRR^{-/-} sont hautement sensibles à l'apparition de chocs aux endotoxines. SIGIRR agit en séquestrant IRAK-1 et TRAF-6 au niveau du TIR domaine du récepteur bloquant ainsi la signalisation en aval du TLR4 suivant une stimulation aux LPS. Les souris déficientes ST2^{-/-} produisent en grandes quantités des cytokines pro-inflammatoires en réponse aux LPS et sont incapables d'initier la tolérance aux LPS (Brint et al., 2004). Une surexpression de ST2 inhibe l'activation de NF- κ B via son association avec MyD88 et TIRAP, inhibant ainsi leurs fonctions.

Les mécanismes d'inhibition de l'activation de la voie de signalisation de TLR/IL1R peuvent également être attribués à l'activation de SOCS1 ou SOCS3, membres de la famille des protéines SOCS. L'activation des MAC par les LPS ou l'ADN contenant CpG induit l'expression de SOCS1 (Stoiber et al., 1999; Dalpke et al., 2001). SOCS1 a la capacité de se lier à IRAK1 et d'inhiber l'activation de NF- κ B chez les MAC stimulés. De plus, il a été observé que SOCS1 peut interagir, via ASK1, au niveau de l'activation de p38 et JNK MAPK et inhiber la réponse inflammatoire (He et al., 2006). Ainsi, les MAC, les CD8 et les fibroblastes provenant de souris déficientes *Socs1*^{-/-} produisent de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires, tel que le TNF- α , l'IL-12, l'INF γ et du NO en réponse à des ligands spécifiques aux TLRs (Kinjyo et al., 2002; Hanada et al., 2005). En surexprimant SOCS3, les CD8 produisent moins d'IL-12 et d'IL-23, expriment moins la molécule CD86 et le CMH II et augmentent leur capacité à sécréter de l'IL-10 réduisant la polarisation d'une réponse de type Th1. Les CD8 devenus tolérogéniques initient donc une réponse de type Th2 observée par une augmentation d'IL-4 produite par les cellules T CD4⁺ activées. Il a été observé chez les CD8 surexprimant SOCS3 l'apparition d'un phénotype dit tolérogénique (Kinjyo et al., 2006). Ce phénotype était associé à une diminution de l'expression du CMH II et de la molécule CD86 et une forte production d'IL-10 favorisant une réponse de type Th2.

L'activation des MAP kinases dans la voie de signalisation des TLRs est régulée négativement par l'action de phosphatases, diminuant ainsi la réponse inflammatoire. Parmi ces phosphatases, la MKP-1 a été identifiée comme étant une protéine inhibitrice de l'activation de la p38 et de la SAPK/JNK MAPK chez les monocytes/MAC activés. L'activation de cette phosphatase cause une baisse de la production de médiateurs inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-12, CCL2) (Salojin et al., 2006). L'utilisation de souris déficientes *mkp1*^{-/-} a permis de démontrer une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires tel que le TNF- α , l'IL-12, l'IL-6 des MAC et des splénocytes (Zhao et al., 2006). Il a également été observé un changement du profil de cytokines produites par les GMDCs chez ces dernières souris. Ainsi, en absence de MKP-1, les GMDCs produisent peu d'IL-12p70 et beaucoup d'IL-10. L'interaction entre MKP-1 et la p38 MAPK serait dépendante du niveau d'acétylation de MKP-1 par le co-facteur p300 (Cao et al., 2008). Une fois acétylé MKP-1 peut se lier à p38 MAPK et inhiber sa phosphorylation. De nombreuses études sont encore nécessaires pour connaître mieux ces protéines et décrire leur rôle respectif dans la voie du TLR4 chez les CD4.

3.6 LE TLR4 ET LES CHOCS SÉPTIQUES

Plus qu'aucun autre membre de la famille des TLRs, le TLR4 est à la croisée des perturbations inflammatoires d'origine infectieuse ou non infectieuse, car il est stimuable aussi bien par le LPS d'origine microbienne que par des molécules endogènes de danger. Une des conséquences les plus sévères lors d'un choc septique est l'apparition d'un état d'immunosuppression suivant une trop forte activation de la réponse inflammatoire. Il a d'abord été observé une augmentation de l'expression du TLR4 chez les leucocytes totaux de patients en choc septique en comparaison avec les leucocytes de patients sains (Harter et al., 2004). Une analyse plus approfondie sur les diverses populations de cellules a démontré que l'augmentation de l'expression du TLR4 s'observe uniquement chez les neutrophiles alors que l'expression du TLR4 est fortement diminuée chez les monocytes (Salomao et al., 2008; Volk et al., 1996). Le mécanisme de cette diminution d'expression des TLRs monocytaires demeure inconnu. L'endocytose des TLRs ou bien un clivage de ces récepteurs libérant ainsi les formes solubles de TLR4 peuvent participer à cette inhibition de l'activation du récepteur. Le

rôle des TLRs dans le choc septique chez l'homme peut également être associé à des mutations génétiques. Ainsi, des mutations non-sens affectant le domaine extracellulaire de TLR4 ont été associées à une altération de la réponse à l'inhalation de LPS (Calvano et al., 2006; Arbour et al., 2000). Finalement, il a été observé que les patients ayant les allèles Asp299Gly/Thr399Ile du TLR4 sont plus susceptibles à des infections Gram⁻ et l'apparition de chocs septiques (Lorenz et al., 2002). D'autres études sont nécessaires pour préciser le rôle des TLRs au cours du choc septique dans le but de développer de nouvelles cibles thérapeutiques.

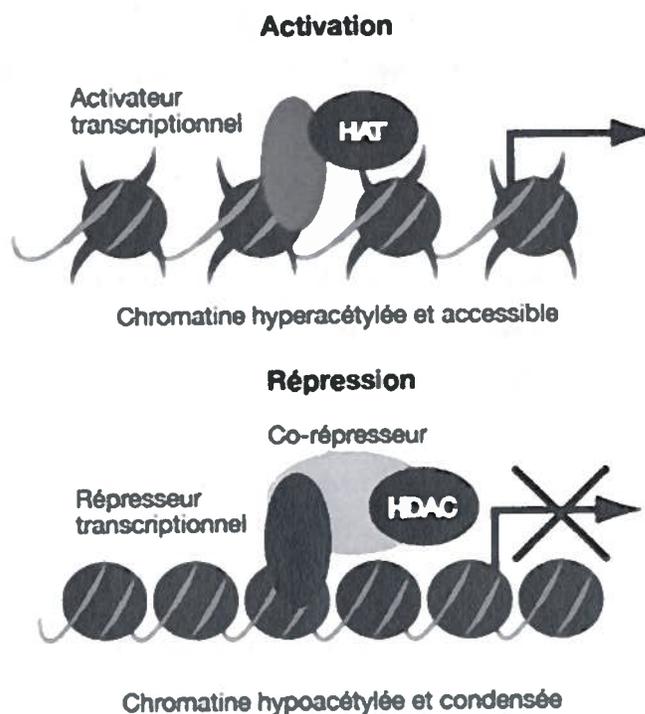
4. LES HISTONES DESACÉTYLASES

4.1 LES MODIFICATIONS ÉPIGÉNÉTIQUES

L'expression de nombreux gènes dépend fortement de la conformation de la chromatine, c'est-à-dire de son degré de condensation. Les régions chromosomiques qui doivent être actives sur le plan transcriptionnel, sont déterminées par les signaux que la cellule reçoit de son environnement. L'état de la chromatine est dicté par des modifications post-traductionnelles des protéines liées à l'ADN, soient les modifications épigénétiques. Ces modifications définissent les changements transmissibles et réversibles de l'expression des gènes sans en influencer la séquence codante. De récentes études ont démontré que les pathogènes peuvent affecter la réponse du système immunitaire via l'induction de modifications épigénétiques des cellules-cibles (El Gazzar et al., 2007a; Hamon et Cossart, 2008). Parmi ces modifications épigénétiques on retrouve les modifications covalentes des histones incluant la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation et l'ubiquitination. Ces modifications ont la capacité d'affecter la structure de la chromatine et la transcription des gènes en changeant les interactions entre les histones et l'ADN et/ou en recrutant des protéines non-histones tels que les facteurs de transcription.

L'importance de l'acétylation des histones a été démontrée dans la programmation cellulaire (Cheung, Allis et Sassone-Corsi, 2000), la production de cytokines (Aung et al., 2006; Brogdon et al., 2007) et la signalisation intracellulaire (Mahlknecht et al., 2004; Rahman, Marwick et Kirkham, 2004). L'équipe de Wienmann a également démontré que l'acétylation des histones H3 et H4 jouait un rôle important dans le remodelage de la chromatine et l'accessibilité des gènes, dont celui codant pour l'IL-12, suivant une stimulation du TLR4 des MAC et des CDs (Weinmann, Plevy et Smale, 1999). L'acétylation est le transfert d'un groupement acétyle provenant de l'acétyl-coenzyme A sur le groupement ϵ -amino de certains résidus lysine (Barnes, Adcock et Ito, 2005). Toutes les histones sont susceptibles d'être acétylées sur des lysines spécifiques dans leur domaine amino-terminal. La neutralisation de la charge positive du groupement NH_3^+ de la lysine mène à une diminution des contacts avec

l'ADN nucléosomique (qui possède une charge négative à cause des groupements PO_4^{3-}), avec les nucléosomes voisins et certaines protéines régulatrices stabilisant la chromatine. Ces modifications produisent une chromatine plus flexible où l'ADN est plus accessible. Deux familles d'enzymes influencent les niveaux d'acétylation des histones (Grabher et al., 1994; Kuo et Allis, 1998): i) les histones acétyltransférases (HATs) qui ont comme rôle d'ajouter des groupements acétyles aux lysines des histones et ii) les histones désacétylases (HDACs) qui ont un rôle contraire aux HATs, c'est-à-dire qu'elles enlèvent les groupements acétyles des histones (**Figure 8**).



(Figure adaptée Wade, 2001)

Figure 8 : Remodelage de la chromatine par les enzymes HATS et HDACs. Dans le noyau, la chromatine est formée d'une répétition de sous-unités appelées nucléosomes. Celui-ci est constitué de 146 pb d'ADN enroulées deux fois autour d'un octamère d'histones. L'acétylation des lysines des histones par les HATs induit le relâchement de la structure de la chromatine ce qui permet l'accessibilité des gènes et la reconnaissance des sites de liaison par les facteurs de transcription. Cela réfère à l'activation transcriptionnelle des gènes cibles. La désacétylation de ces mêmes histones est initiée par les HDACs. Cette modification induit le compactage de nouveau de la chromatine autour du nucléosome, inhibant la transcription des gènes.

De part leur rôle, les enzymes HDACs, plus spécifiquement celles de la classe I, jouent un rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire et probablement dans certaines pathologies humaines (Lu et al., 2005; Mahlknecht et al., 2004; Musikacharoen, Yoshikai et Matsuguchi, 2003; Ito et al., 2006a).

4.1.1 Le désacétylation des histones HDACs

Les histones désacétylases (HDACs) sont des enzymes qui enlèvent les résidus de lysine dont leur activité est plutôt associée à une conformation fermée de la chromatine. On distingue actuellement 18 HDACs humaines se répartissant en trois grandes familles d'HDACs dans les cellules de mammifères (Gregoretta, Lee et Goodson, 2004).

- . Classe I : HDAC1, -2, -3, -8 et -11
- Classe II : HDAC4, -5, -6, -7, -9 et -10
- Classe III : SIRT1, -2, -3, -4, -5, -6 et -7

Plusieurs travaux ont corroboré l'importance des HDACs et de leurs mécanismes dans le processus inflammatoire de certaines pathologies, telles que les maladies respiratoires, l'arthrite et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Halili et al., 2009). Il a été démontré une diminution de l'activité HDAC au sein de la muqueuse chez les patients asthmatiques modérés (Ito et al., 2002), mais aussi chez les fumeurs (Ito et al., 2001b). L'exposition à la fumée de la cigarette inhibe l'activité HDAC et augmente l'expression des cytokines inflammatoires au niveau des cellules épithéliales bronchiques. Ils ont démontré que la perte d'activité anti-inflammatoire des corticostéroïdes est en partie due à l'inactivation de l'HDAC-2 par des médiateurs du stress oxydant contenus dans la fumée de cigarette (Barnes, Ito et Adcock, 2004). L'HDAC est donc une molécule clé dans l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires par les MAC alvéolaires et/ou les cellules épithéliales bronchiques. Les travaux de l'équipe de Barnes ont observé une réduction de l'activation HDAC au niveau des MAC alvéolaires chez les patients atteints de Broncho-pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO – *Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)*) (Ito et al., 2005).

L'arthrite rhumatoïde est une maladie auto-immunitaire caractérisée par une production élevée, dans l'espace synovial, de médiateurs pro-inflammatoires, tels la PGE₂, le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6. Il a été suggéré qu'une diminution de l'activation des HDACs au niveau des tissus synoviaux, de patients atteints d'arthrite rhumatoïde, favoriserait un relâchement de la chromatine occasionnant ainsi l'augmentation des médiateurs inflammatoires (Huber et al., 2007). De part ces faits, une diminution et/ou une perturbation de l'activité des HDACs influence la réponse inflammatoire.

4.1.1.1 HDACs de classe I

Ces enzymes de classe I sont exprimés dans la plupart des tissus et se retrouvent de façon ubiquitaire dans le noyau à l'exception de HDAC3 qui peut se retrouver autant dans le cytoplasme que dans le noyau dépendamment du type cellulaire et du niveau de stimulation étudiés (Sengupta et Seto, 2004). Ces HDACs de classe I agissent comme corépresseurs et sont homologues au corépresseur de la transcription Rpd3 chez la levure. L'activité de répression des HDACs peut se faire via leur association avec des co-répresseurs, tels que le co-répresseur des récepteurs nucléaires (NCoR) ou la protéine mSin3 (le complexe Sin3), qui interagissent directement avec des séquences sur les gènes cibles. Dans ce contexte, les HDACs sont recrutées sur les gènes cibles via leur interaction avec ces corépresseurs. Les HDACs peuvent également interagir directement avec des séquences spécifiques sur les facteurs de transcription et induire la répression des gènes. De par leur activité, ces enzymes jouent un rôle central dans la modification de la structure de la chromatine et, par conséquent, dans la régulation de la transcription des gènes de la réponse inflammatoire.

Les HDAC1 sont impliquées dans la régulation des gènes dépendants du facteur de transcription NF- κ B. NF- κ B est présent majoritairement dans le noyau des cellules non stimulées sous forme d'homodimères p50/p50. HDAC1 peut se lier à ces homodimères grâce à leur capacité à se fixer aux sites κ B situés sur l'ADN et ainsi réprimer l'expression des gènes (Zhong et al., 2002). Après stimulation, les

hétérodimères p50/p65 phosphorylés sur la p65 (Zhong et al., 2002) migrent du noyau, déplacent les complexes p50/p50:HDAC1 des sites κ B et activent l'expression des gènes dépendant de NF- κ B. La forme phosphorylée de la p65 s'associe avec le CBP/p300, une acétylase HAT qui permet le recrutement de co-facteurs essentiels à la transcription des gènes. Une faible quantité de la sous-unité p65 non phosphorylée est présente dans le noyau des cellules non stimulées et est associée à HDAC1, empêchant toute interaction avec la CBP/p300. L'état de phosphorylation de p65 détermine donc si la forme nucléaire de NF- κ B s'associe avec HDAC1 ou avec CBP/p300. Ce mécanisme de régulation permet de garantir que seuls les hétérodimères p50/p65 phosphorylés sur la p65 sont capables d'activer la transcription des gènes dépendant de NF- κ B (Zhong et al., 2002).

Le promoteur du gène de l'IL-12p40 est également sujet à l'action de HDAC1. Lu et ses collaborateurs ont démontré que HDAC1 a la capacité de supprimer l'activité du facteur de transcription C/EBP β et par conséquent inhiber la transcription du gène IL-12p40. À l'opposé, l'HAT p300 initie, dans un premier temps, l'acétylation de l'histone H3 dans la région du promoteur de l'IL-12 et le recrutement du co-activateur C/EBP β afin d'enclencher la transcription du gène (Lu et al., 2005). Contrairement à ces études démontrant l'action répressive des HDACS sur les gènes de la réponse inflammatoire, l'équipe de Bode a observé que les HDACs de la classe I jouent également un rôle dans l'initiation de la transcription du gène de l'IL-12p40 chez les CD4 (discuté dans la section 4.2 **Les modulateurs de l'activité des HDACs**) (Bode et al., 2007). Un des mécanismes par lequel les HDACs pourraient positivement réguler le recrutement des facteurs de transcription serait via des modifications post-traductionnelles sur les promoteurs des gènes cibles. Cependant, ces mécanismes sont encore inconnus.

Le rôle de l'HDAC2 n'est pas encore élucidé, mais des études ont démontré qu'elle est impliquée dans la suppression des gènes inflammatoires via une augmentation de la sensibilité aux glucocorticoïdes (discuté dans la section portant sur les activateurs de HDACs) (Ito, Barnes et Adcock, 2000; Cosio et al., 2004). De plus, chez des MAC alvéolaires il a été démontré que l'activation d'HDAC2 au complexe de transcription formé de la sous-unité p65/ADN diminue la réponse inflammatoire et augmente la sensibilité aux corticostéroïdes (Ito et al., 2002).

Tout comme pour l'HDAC1, l'HDAC3 participe également à la désacétylation de la sous-unité p65. Cependant son action a pour effet d'induire la liaison de la p65 avec la protéine inhibitrice I κ B α enclenchant son exportation du noyau vers le cytoplasme (Ozawa et al., 2001; Wen et al., 2003). À l'opposé, une étude a démontré que HDAC3 peut également être impliquée dans l'activation de la transcription par NF- κ B de part sa capacité de former des complexes avec la forme cytoplasmique libre de I κ B α (Viatour et al., 2003). Suite à cette interaction entre la forme libre d'I κ B α et HDAC3, il y a augmentation de la transcription des gènes NF κ B-dépendants. Chez les monocytes, il a également été observé que l'HDAC3 peut se lier à la protéine MAPK11 inhibant l'activation transcriptionnelle du facteur ATF-2 sur le gène TNF, supprimant la production de TNF suite à une stimulation aux LPS (Mahlknecht et al., 2004).

4.1.1.2 HDACs de classe II

Elles sont des enzymes tissus spécifiques et peuvent passer du noyau au cytoplasme en réponse à divers signaux cellulaires. Elles sont aussi parfois subdivisées en deux sous-classes : HDACs IIa (HDACs 4, 5, 7 et 9) et HDACs IIb (HDACs 6 et 10) (Dutnall et Pillus, 2001). Ces protéines, nouvellement identifiées, ont des domaines désacétylases similaires à Hda1 chez la levure. HDAC4, HDAC5 et HDAC7 sont des co-répresseurs de la transcription qui interagissent avec la famille des facteurs de transcription MEF2 et les co-répresseurs N-CoR, BCoR et CtBP.

Il a été observé qu'une stimulation aux LPS augmentait l'expression génique de certaines HDACs, dont HDAC1, 4, 5, 6, 8, 9 et 10 chez les MAC (Aung et al., 2006). À la lumière de cette étude, il semblerait que les HDACs de classe I et II soient également impliquées dans la régulation de certains gènes pro-inflammatoires.

4.1.1.3 HDACS de classe III

La classe III des HDACs ne montre aucune similitude avec les HDACs de classe I et II. Ce sont des HDACs similaires à ySIR2 (*yeast Silent Information Regulator 2*) qui prédominent au niveau du cytoplasme et dont l'activité enzymatique dépend de la NAD^+ (Dutnall et Pillus, 2001). On y retrouve SIRT 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7. Cette classe d'HDACs est la moins bien caractérisée.

4.1.1.4 HDACS d'autre classe

Enfin, l'HDAC11 possède des homologies à la fois avec les HDACs de classe I et avec celles de classe II. Pour cette raison, elle n'est classée dans aucune des différentes classes. Elle semble jouer un rôle important dans la genèse de certains cancers (Voelter-Mahlknecht, Ho et Mahlknecht, 2005).

4.2 LES MODULATEURS DE L'ACTIVITÉ DES HDACS

Le rôle répresseur transcriptionnel des HDACs peut être modulé par certaines molécules appelées inhibiteurs ou activateurs d'enzymes désacétylases (Marks, Richon et Rifkind, 2000). L'utilisation de tels modulateurs fait partie des nouveaux moyens thérapeutiques envisagés pour lutter contre de nombreuses maladies associées à une dérégulation transcriptionnelle de gènes et/ou à une perturbation de l'activité des HDACs. Ces molécules constituent actuellement un grand espoir de remèdes contre certains cancers ou maladies inflammatoires chroniques.

4.2.1 Les iHDACs et leur rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire

Les inhibiteurs d'HDACs (iHDACs) représentent une nouvelle classe de médicaments anticancéreux actuellement en développement clinique. Plusieurs études ont démontré qu'en inhibant les HDACs de classe I et II, ces inhibiteurs provoquent l'arrêt de la prolifération des cellules cancéreuses (Marks et al., 2001). Ainsi, la caractérisation d'inhibiteurs spécifiques de certains effecteurs épigénétiques a ouvert une nouvelle

voie thérapeutique, la thérapie épigénétique, qui semble très prometteuse. L'utilisation de ces iHDACs a également démontré un effet bénéfique dans le traitement de maladies inflammatoires (Adcock, 2007), telles que l'asthme (Choi et al., 2005) ou l'arthrite (Lin et al., 2007). Les iHDACs peuvent être classés en plusieurs catégories en fonction de leur structure (Dokmanovic et Marks, 2005).

Les hydroxamates. Parmi cette classe, on retrouve notamment la trichostatine A (TSA) et l'acide hydroxamique suberoylanilide (SAHA) qui sont deux des iHDACs les plus connus. Ils inhibent les HDAC de classes I et II mais sont inefficaces sur les enzymes de classe III (Blanchard et Chipoy, 2005). Des études ont démontré l'importance de ces deux molécules, plus particulièrement dans la suppression des cellules cancéreuses. Il a aussi été démontré l'efficacité de ces inhibiteurs au niveau de la régulation de la réponse inflammatoire. Ainsi, une administration orale de SAHA chez des souris, préalablement exposées aux LPS, cause une diminution de cytokines telles que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et l'INF γ (Leoni et al., 2002). Une autre étude a également démontré une réduction considérable de la sécrétion d'IL-12p40, d'IL-6, d'IFN- β ainsi que la maturation des CD 4^+ stimulées via leurs TLRs en présence de TSA ou de SAHA (Bode et al., 2007). Le traitement à la TSA ou à la SAHA induit une inhibition de l'ARNm et de la protéine IL-12p40 chez les CD 4^+ stimulées via leur TLR4 (LPS). Cette suppression d'IL-12p40 est, en partie, due à une diminution du recrutement de facteurs de transcription (RelA et IRF-1) au niveau du promoteur. À noter que cette inhibition de la réponse inflammatoire des CD 4^+ n'est pas attribuable à une cytotoxicité, puisque les concentrations utilisées d'iHDACs n'affectaient pas la viabilité des cellules (Bode et al., 2007).

Les iHDACs sont également utilisés dans le traitement expérimental pour le lupus érythémateux systémique (LES). Le LES est une maladie auto-immunitaire caractérisée par une production soutenue de cytokines des cellules T, une activation des cellules B polyclonale et la sécrétion d'auto-anticorps et d'une inflammation au niveau des reins. L'équipe de Mishra a démontré l'effet bénéfique des iHDACs TSA et SAHA chez les souris MRL^{-lpr/lpr}, un modèle murin reproduisant la pathologie LES (Mishra et al., 2003). L'utilisation des iHDACs a eu pour effet d'inhiber la production l'IL-6, l'IL-10, l'IL-12, d'INF γ au niveau des splénocytes et des cellules T isolés. Il a également été démontré que des injections sous-cutanées de TSA chez les

souris MRL^{-lpr/lpr} réduisaient significativement l'apparition de protéinurie, de glomérulonéphrite, de splénomégalie et d'une défaillance rénale sans en changer les niveaux d'auto-anticorps (Mishra et al., 2003).

La TSA, étant très toxique à des concentrations de l'ordre des micromolaires, rend son utilisation difficile pour des études *in vivo*. D'autres iHDACs, tels que le CBHA (*carboxycinnamic acid bishydroxamide*) ainsi que ses dérivés (LAQ-824 et *sulfonamide hydroxamic acid*) ont été développés. Il a été démontré que le LAQ-824 induit une diminution de la réponse immunitaire de type Th1 suivant une stimulation du TLR4 des CD. En présence de LAQ-824, les CD ne peuvent sécréter les cytokines immunostimulatrices (IL-12, IL-15), des chimiokines (ITAC, MIG, IP10) et exprimer la molécule CD40 suite à une stimulation aux LPS (Brogdon et al., 2007). Le LAQ-824 inhibe également la capacité des CD à initier la production d'IFN- γ (Th1) des cellules T activées et favorise plutôt la production d'IL-4 (Th2). Des essais de chimiotactisme ont également démontré que l'iHDAC LAQ-824 altérerait la migration des cellules T de type Th1 vers des cultures de CD sans affecter la migration des cellules T Th2 (Brogdon et al., 2007). Cet inhibiteur est généralement actif à des concentrations de l'ordre d'une centaine de nanomolaires.

Les peptides cycliques. Ils constituent la classe la plus complexe au niveau structurel. On y retrouve notamment le depsiptide, la trapoxine et l'apidicine. Ces inhibiteurs sont actifs à des concentrations de l'ordre du nanomolaire. A part le depsiptide, leur efficacité dans les traitements médicaux reste à prouver.

Les acides aliphatiques. Il s'agit d'une classe comprenant de petits acides gras. Les principaux inhibiteurs de cette classe sont le valproate, le phénylbutyrate et le butyrate de sodium. Le butyrate de sodium inhibe les HDACs de classe I et II à l'exception de l'HDAC6 et 10 et est actif seulement à des concentrations de l'ordre du millimolaire. Une étude a démontré l'efficacité de cet iHDACs dans la suppression de la production d'IL-12 chez les monocytes stimulés aux LPS (Saemann et al., 2000). Le butyrate de sodium est, parmi les iHDACs, celui qui a été le plus utilisé lors d'études *in vitro* (Davie, 2003). Toutefois, *in vivo*, ce composé a été abandonné à cause de sa courte demi-vie.

Les benzamides. Leur pouvoir iHDACs est moins puissant que pour les autres classes. La molécule la plus utilisée de cette classe est le MS-275 qui possède des propriétés anticancéreuses intéressantes, notamment dans les cancers de la prostate (Qian et al., 2007), des reins (Kato et al., 2007) et certaines leucémies (Shankar et al., 2005).

4.2.2 Les activateurs d'HDACs et leur rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire

Jusqu'à présent, certains produits ont été identifiés comme étant des activateurs d'HDACs (aHDACs) dont la théophylline xanthine (Ito et al., 2001a), le resveratrol polyphénole (Howitz et al., 2003) et le curcumin (Marwick et al., 2007). La théophylline a fait l'objet de plusieurs études et est maintenant utilisée dans le traitement de l'asthme et de la maladie pulmonaire obstructive chronique (COPD).

La sévérité de la maladie COPD est due à l'activation des éosinophiles, des monocytes/MAC et, dans certains cas, à l'activation des neutrophiles au niveau des poumons (Barnes, 2002). Ces cellules sont responsables de la production de chimiokines (à motifs C-X-C (IL-8 et CCL3)), de cytokines (TNF- α , IFN- γ), de facteurs de croissance, de réactifs d'oxygène, et autres au niveau des poumons. L'expression de ces gènes pro-inflammatoires est régulée par des facteurs de transcription tels que le NF- κ B, AP-1, STAT et par des modifications des histones. Chez les patients COPD, l'activité HDAC est significativement réduite au niveau du parenchyme pulmonaire, plus spécifiquement au niveau de l'HDAC2 (Barnes, 2002). Les mécanismes qui induisent la réduction d'activité des HDACs restent encore à être élucidés. Toutefois, la présence d'anions superoxydes et de NO chez les patients COPD induit la nitration des résidus de tyrosine de l'HDAC2 diminuant son activité et augmentant sa susceptibilité à la dégradation via le protéasome (Tomita, Barnes et Adcock, 2003; Ito et al., 2004). Il est clairement établi que la réduction de l'activité d'HDAC2 corrèle avec l'apparition de la résistance aux corticostéroïdes, un des traitements utilisés chez les patients asthmatiques ou COPD. Les corticostéroïdes exercent leurs effets en se liant à des récepteurs à glucocorticoïdes (GR) présents dans le cytoplasme. Lorsqu'il y a liaison cortico-GR, celui-ci devient activé et est

transloqué au noyau. Il peut donc se lier à des séquences spécifiques de l'ADN afin d'interagir avec des complexes co-activateurs (Adcock et Caramori, 2001). Les corticostéroïdes peuvent supprimer l'inflammation en augmentant l'expression de protéines anti-inflammatoires (IL-10, IκB), en réprimant l'action des MAPKs ou des facteurs de transcription (NF-κB, AP-1) (Adcock et Caramori, 2001). Cette capacité à supprimer les gènes inflammatoires est dépendante du recrutement d'HDAC2 au complexe transcriptionnel actif par le GR (Ito, Barnes et Adcock, 2000). Chez les patients dits corticorésistants, l'utilisation de théophylline, à de faibles doses, provoque un rétablissement de la sensibilité aux corticostéroïdes et une diminution de la sévérité de la maladie. Bien que ses mécanismes soient encore inconnus, la théophylline semble avoir un effet bénéfique sur l'activation des HDACs de classe I (Barnes, 2003). À de faibles concentrations (10^{-7} à 10^{-5} M), la théophylline augmente significativement l'activité totale des HDACs, de classe I causant une diminution de l'infiltration d'éosinophiles dans les voies respiratoires des patients asthmatiques (Ito et al., 2001a). Par contre, de fortes concentration de théophylline n'affecte pas l'activité des HDACs, mais cause plutôt une hausse de l'AMPc. Un traitement combinant l'utilisation de corticostéroïdes et de théophylline, à faibles concentrations, présente de très grands avantages au niveau du contrôle de la réponse inflammatoire.

Selon ces études, les HDACs semblent jouer un rôle dans l'expression de certains gènes au niveau des monocytes/MAC, des CD8 et des cellules T et sont impliquées dans la régulation de la réponse inflammatoire. L'utilisation des modulateurs des HDACs présentent un potentiel thérapeutique intéressant chez les modèles expérimentaux de traumatismes sévères, où de profondes perturbations de la réponse inflammatoire sévère sont observées.

CHAPITRE 2 : OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

Le but de ce projet de recherche a été d'évaluer les compétences des CD4 lors de la réaction CARS suivant une brûlure sévère. Ce projet de recherche a été élaboré à partir de CD4 isolées de la rate d'un modèle murin de la brûlure sévère qui ont été stimulées *ex vivo*. À partir d'une lignée de CD4 différenciées en présence de Flt-3L, nous avons pu identifier les mécanismes responsables de l'apparition de la tolérance aux LPS, phénomène s'apparentant à celui observé lors de la réponse CARS post-trauma.

Les cellules dendritiques et la brûlure sévère

Tout comme pour les chocs septiques, il a été observé, à la suite d'une brûlure sévère, l'apparition du syndrome de la réponse inflammatoire systémique (SRIS) dans la phase initiale (Bone, 1994). L'aggravation du SIRS enclenche aussitôt une réaction dite anti-inflammatoire compensatoire (CARS). L'émergence de cette réaction CARS représente un facteur de risque dans l'apparition de septicémies, puisqu'une dépression immunitaire s'installe rendant l'organisme vulnérable aux infections nosocomiales. Les perturbations des fonctions des MAC et des lymphocytes T lors du CARS ont été démontrées jusqu'à ce jour. Le lien entre l'immunité innée et adaptative est présentement établi et montre un rôle spécifique dans l'immunosuppression observée lors du CARS et l'intensité du SIRS. Bien qu'il a été démontré que des injections de Flt-3L permettait une récupération de la réponse immunitaire acquise en réponse à des pathogènes via une expansion de CD4 professionnelles et de cellules NK (Toliver-Kinsky et al., 2003), l'implication des CD4 dans le développement du CARS est peu connue.

À partir du modèle murin de brûlure sévère, les objectifs ont donc été :

- i. Évaluer les compétences des CD4 de la rate lors de la réaction CARS post-brûlure ;
- ii. Caractériser l'impact d'une brûlure sévère sur la capacité des CD4 spléniques à répondre à une stimulation *ex vivo* de leur TLR4.

La tolérance aux endotoxines et les cellules dendritiques

Une activation inappropriée des CD, telle qu'observée suivant la brûlure sévère, peut engendrer une reprogrammation des cellules. Cet état s'apparente fortement au phénomène de la tolérance aux endotoxines qui survient majoritairement après une suractivation de la réponse inflammatoire. La majorité des études portant sur les mécanismes responsables de cette induction de tolérance ont été faites chez les MAC. Il a été observé, chez cette population, une augmentation de l'expression de molécules inhibitrices de la voie de signalisation du TLR4 (IRAK-M, protéines SOCS, TOLLIP, MKP-1) associée à une polarisation des cytokines de type Th1 vers des cytokines de type Th2 (Fan et Cook, 2004; Cavaillon et Adib-Conquy, 2006). Il a aussi été proposé que l'induction de la tolérance aux LPS est le résultat de modifications au niveau du remodelage de la chromatine des gènes de la réponse inflammatoire via l'acétylation ou la désacétylation des histones (El Gazzar et al., 2007b; McCall et Yoza, 2007).

De part ces faits, les objectifs suivants de l'étude ont été fixés :

- i. Élaborer un modèle d'étude *in vitro* de tolérance aux LPS à partir des FLDCs ;
- ii. Caractériser les mécanismes impliqués dans l'apparition de tolérance aux LPS ;
- iii. Caractériser le rôle des HDACs dans la régulation de l'IL-12p40 des FLDCs lors de l'induction de tolérance aux LPS.

CHAPITRE 3 : ARTICLE I

Mise en contexte

Malgré les avancées thérapeutiques récentes, la brûlure sévère demeure un des traumatismes qui affecte plusieurs systèmes de l'organisme humain et dont on observe un haut taux de morbidité et de mortalité. Au courant des 50 dernières années, le développement de modèles expérimentaux *in vivo* de la brûlure sévère ont facilité l'étude de ce traumatisme sévère sur les paramètres physiologiques et immunologiques et l'émergence de traitements thérapeutiques (Schildt et Nilsson, 1970; Dahiya, 2009). L'étude des perturbations immunitaires post-trauma, similaires à celles observées chez les patients gravement brûlés, a été possible grâce au modèle murin soumis à une brûlure sévère représentant 20% de la surface corporelle (Dahiya, 2009). Quelques heures à quelques jours suivant une brûlure sévère, une réponse inflammatoire se développe conduisant au SRIS. Une fine balance existe entre les effets bénéfiques et les effets néfastes de l'inflammation. Bien que cette réponse soit essentielle, elle résulte souvent à des complications majeures, dont l'apparition du syndrome de lésions multiples des organes (Bone, 1994). Pendant cette phase initiale de la brûlure, la présence de plusieurs ligands naturels du TLR4 induit une activation de cellules de l'immunité dont les macrophages, les neutrophiles et les CD_s. Il a été observé une production accrue de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α) par les CD_s stimulées *ex vivo* via leur TLR4 (Paterson et al., 2003). Par la suite, l'absence de contrôle de la réponse anti-inflammatoire conduit au développement du CARS (Murphy et al., 2004). La principale conséquence de ce dernier syndrome est l'établissement d'un état d'immunosuppression prolongé ayant des conséquences néfastes pour l'hôte. Les principaux changements observés jusqu'à présent sont l'hyperactivation des MAC (Schwacha, 2003), une production de cytokines de type Th2 (Lyons et al., 1997a) et l'apparition d'un état d'anergie des lymphocytes T (Goebel et al., 2000; Rodrick et al., 1986). Notre équipe de recherche a également observé que l'immunosuppression était la conséquence d'une forte induction de l'apoptose des cellules T CD₄⁺ naïves précédée par une activation de ces dernières, changeant ainsi l'homéostasie des lymphocytes T présents dans la rate (Patenaude et al., 2005). Associée à cette suppression de l'activation des cellules T CD₄⁺ naïves, une augmentation importante de CD_s présentes dans la rate a été observée. Phénomène qui était beaucoup moins accentué au niveau des ganglions se situant en périphérie de la brûlure sévère (i.e. ganglions axillaires et inguinaux). Bien qu'une

augmentation de CD8 fût notée, les fonctions de ces dernières sembleraient être perturbées par la brûlure sévère. Il a été démontré que des injections de Flt-3L augmentaient significativement le taux de survie du modèle murin de brûlure sévère infecté à la *P. aeruginosa*, et ce, entre le 5^e et 10^e jour (Toliver-Kinsky et al., 2003). Cette hausse était attribuable à une expansion du nombre de CD8 dites professionnelles et de cellules NK. Ces deux types cellulaires étaient impliqués dans le rétablissement de la production d'IFN- γ et d'IL-12, deux cytokines fortement supprimées lors de la phase CARS post-brûlure. De part ces études, les CD8 semblent jouer un rôle essentiel dans la suppression du système immunitaire post-brûlure. Cependant, peu d'études ont élucidé l'impact d'une brûlure sévère sur les fonctions des CD8 ainsi que leur rôle dans l'apparition de l'état d'immunosuppression.

À partir du modèle murin de brûlure sévère, nous avons voulu caractériser :

1. Les compétences des CD8 lors de la réponse CARS ;
2. L'impact de la brûlure sévère sur la capacité des CD8 à répondre à une stimulation *ex vivo* de leur TLR4 ;
3. L'effet de la brûlure sévère sur les sous-populations de CD8 CD8 α^+ versus CD8 α^- présentes dans la rate lors de la réponse CARS;
4. Le rôle des CD8 CD8 α^+ versus CD8 α^- dans l'initiation de la réponse Th1 suivant une activation *ex vivo* de leur TLR4.

Résumé français

Selective effect of burn injury on splenic CD11c⁺ dendritic cells and CD8 α ⁺CD4⁺ CD11c⁺ dendritic cell subsets.

Patenaude Julie*, D'Elia Michele*, Hamelin Claudine*, Bernier Jacques*

* INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec

Les CD sont des CPA dont la reconnaissance de pathogènes par leurs TLRs induit leur activation et leur maturation. Cette étape est essentielle dans l'initiation de la réponse immunitaire acquise de par leur rôle dans l'activation des lymphocytes T naïfs. Dans cette étude, nous avons étudié l'impact de la brûlure sévère sur l'activation du TLR4 des CD durant la période tardive CARS (10^e jour). L'émergence de cette réaction aggravée représente un facteur important dans l'apparition de septicémies, puisqu'un état d'immunosuppression s'installe. Durant cette période tardive, nous avons noté que les fonctions des CD en tant que CPA étaient altérées en comparaison avec les CD du groupe témoin. Ces perturbations fonctionnelles ont été caractérisées par une suppression de la capacité des CD à activer des cellules T naïves en présence de ligands spécifiques pour le TLR4 (LPS ou rHSP60). Cet affaiblissement de l'activité des CD isolées du groupe brûlé était associé à une diminution de l'expression génique du TLR4 ainsi qu'à une réduction de l'expression du récepteur TLR4/MD-2 en surface. Chez le groupe brûlé, les CD stimulées en présence de LPS ont montré une inhibition de la production d'IL-12p40 et une augmentation de la sécrétion d'IL-10. Ces altérations étaient observées uniquement chez une sous-population de CD. Ainsi, nous avons observé une diminution de l'expression du TLR4/MD-2 chez les CD CD8 α ⁺. Après une stimulation aux LPS, cette diminution du récepteur a persisté chez les CD CD8 α ⁺ en comparaison avec les CD CD8 α ⁻. De paire avec cette observation, nous avons démontré que les CD CD8 α ⁺ stimulées aux LPS synthétisaient moins d'IL-12 intracellulaire. Nos résultats suggèrent donc que la voie d'activation du TLR4 des CD est grandement affectée par la brûlure sévère. Nous pensons que ces perturbations observées chez les CD CD8 α ⁺ présenteraient un facteur important dans l'inhibition de l'activation des cellules T vers une réponse Th1 lors de la phase CARS.

Cette sous-population de CD8 semble jouer un rôle dans l'établissement de l'état d'immunosuppression suivant la brûlure sévère.

Manuscrit publié dans *Cellular and Molecular Life Science*.

Contribution des auteurs

Michele D'Elia et moi avons fait les mises au point quant à l'élaboration du modèle murin de la brûlure sévère. Par la suite, j'ai réalisé toutes les expériences décrites dans cet article ainsi que l'analyse. J'ai écrit ce manuscrit en collaboration avec le Dr Bernier.

**SELECTIVE EFFECT OF BURN INJURY ON SPLENIC CD11c⁺ DENDRITIC
CELLS AND CD8 α ⁺CD4⁻CD11c⁺ DENDRITIC CELL SUBSETS.**

**Selective effect of burn injury on splenic CD11c⁺ dendritic cells and CD8 α ⁺CD4⁻
CD11c⁺ dendritic cell subsets.**

Patenaude Julie^{*}, D'Elia Michele^{*}, Hamelin Claudine^{*}, Bernier Jacques^{*}

* INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec

Address for correspondence and reprint requests:

INRS-Institut Armand-Frappier

531 boul. des Prairies

Laval (Québec) H7V 1B7

jacques.bernier@iaf.inrs.ca

Tél.: (450)687-5010

Fax : (450)686-5566

Abstract

Burn injury causes an immunosuppression associated with suppressed adaptive immune function. Dendritic cells (DCs) are antigen-presenting cells (APCs) that signaling via their Toll-like receptors (TLRs) induces their maturation and activation, which is essential for the adaptive immune response. In this study, we examined if burn injury alters the TLR activity of splenic DCs. After injury, we noticed that DC functions were impaired, characterized by a suppressed capacity to prime naive T cells when triggering the TLR4 signaling cascade using specific ligands (LPS or rHSP60). The observed perturbations on LPS-primed DCs isolated from burned mice exhibited significantly diminished IL-12p40 production and enhanced IL-10 secretion associated impairment in MAPK kinase activation. Interestingly, we observed a decrease of TLR4/MD-2 expression on CD8 α^+ DC subset that persisted following LPS stimulation. The altered TLR4 expression on LPS-stimulated CD8 α^+ DCs was associated with reduced capacity to produce IL-12 after stimulation. Our results suggested that TLR4 reactivity on DCs, especially on CD8 α^+ DCs, is profoundly disturbed after burn injury.

Key Words: Dendritic cells; toll-like receptor; TLR4; burn injury; CD8 α^+ DC subset; lipopolysaccharides; HSP60; MAP kinase; interleukin-12; interleukin-10; cellular reprogramming.

Introduction

Dendritic cells (DCs) are unique in their capacity to prime naive T cells and initiate immune response [1]. This property correlates with their ability to enhance antigen peptides/MHC, costimulatory molecules expression and their ability to produce cytokines when they are stimulated [2]. However, DCs do not display a constitutive co-stimulatory function in situ and are immature immunologically. DCs undergo maturation upon pathogen entry, tissue damage, or danger signals [3]. Maturation is characterized by an enhanced expression of both MHC-class II and co-stimulatory molecules, a production/secretion of stimulatory cytokines and their responsiveness to chemokines leading them to the T-cell-rich areas of lymphoid organs [2,4]. In mice, 3 classes of lymphoid organ-resident conventional DC subsets coexist in spleen ($CD8\alpha^+CD4^-$, $CD8\alpha^-CD4^+$ and $CD8\alpha^-CD4^-$) which selectively regulate differently the development of Th1 versus Th2 response depending of local environment [5]. IL-12 is produced mainly by $CD8\alpha^+$ DCs that are associated with the Th1 response [6]. In contrast, $CD8\alpha^-$ DCs can also produce IL-12 but trigger a Th2 response in the presence of IL-10 producing cells in their microenvironment [6].

Maturation and function of DCs are influenced by endogenous and exogenous signals like cytokines and pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) which bind to pattern recognition receptors (PPRs) [7,8]. The most common PPRs express on DCs are the Toll-like receptors (TLRs) which discriminate between different types of pathogens. Conserved PAMPs such as bacterial lipopolysaccharides (LPS), peptidoglycan or CpG DNA motif bind to specific TLRs [8]. Moreover, putative endogenous ligands such as endogenous fibrinogen and heat shock protein can also interact with TLRs [9]. With regard to DC maturation, many ligands have been

identified such as LPS for TLR4/MD-2 or lipoproteins for TLR2 [10]. Ligand binding to TLRs lead to dimerization and conformational changes that are required for the recruitment of downstream signaling molecules. The signaling pathway from MyD88 leads to the activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK), including p38, ERK1/2 and JNK/SAPK and the downstream activation of transcription factors such as NF- κ B and AP-1 which control the inflammatory response [10,11]. The LPS-activated DCs produce different types of cytokines depending of the DC subsets and can direct the activation and differentiation of naive CD4⁺ T cells into Th1, Th2, Th17, or regulatory T cells [12].

Severe burn injury induces an immunosuppressive state which is responsible for the development of opportunistic infections that can lead to sepsis, and increase mortality [13-17]. It is well established that burn injury induces a systemic inflammatory response syndrome (SIRS) [18]. For the majority of burned patient SIRS persists for several days and is often followed by the compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS). The latter syndrome causes a decrease in cell-mediated immune response, which may explain the frequency of septicemia following burn injuries [19]. Our group and others have noted that the immune depression observed after burn injuries is attributed to CD4⁺ T cell impairment causing suppressed Th1 function [15,17,20-22]. Antigen presentation is the first step in the initiation of CD4⁺ T cell-mediated responses suggesting that the impaired T cell response following injury may be related to APC function. Cell types that have the ability to present antigen to CD4⁺ T cells are DCs, macrophages, and B cells [2]. It was demonstrated that defect in the T cell-mediated adaptive immune response can be exacerbated by perturbations of macrophages [23-27]. However, contribution of DCs in T cell dysfunction following

burn injury is poorly documented. After burn injury, it was reported that Fms-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L) treatments resulted in both stimulation of DC production and enhancement of DC functions restoring their ability to support Th1 cytokines production [28-30]. Previous research from our laboratory using endotoxin mice strain (C3H/HeJ) which has a mutation in the TLR4 receptor, demonstrated that LPS unresponsiveness induced a more pronounced immunosuppression state and an intensive oxidative stress in burn mice [31]. This suggests a role of TLR4 signaling in the control of immune response after burn injury. Burn injury is associated with disrupt normal homeostasis and increase in bacterial translocation, which results in predisposition to infection with a variety of potential pathogens, such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, all gram-negative bacteria. McManus and colleagues found that 10% of all burned patients admitted to burn units developed *P. aeruginosa* bacteremia and 80% of those died [32]. Endotoxin (LPS) is a major component of the outer membrane of Gram-negative bacteria and a critical actor in the pathogenesis of Gram-negative sepsis. This multistep recognition process is initiated by the binding of LPS to the LPS-binding protein (LBP) that conveys LPS to a cell surface receptor complex composed of MD-2 and TLR4 [33]. Given its central role in the pathogenesis of Gram-negative sepsis following burn injury, we assumed that TLR4 is one of the main receptor involved in the immune response following burn injury. More recently, it was established that burn injury primes DCs TLR-mediated responses and contributes to heighten the SIRS [34]. An over stimulation of DCs in the early state after burn injury could induce a desensitized phenotype of those cells against further pathogens. Long-term consequence of severe burn injury on DC differentiation is not yet established at this time. This is particularly important since

an alteration in DC subtypes can influence T cell response and the immune homeostasis after burn injury.

The aim of our work was to determine the consequence of burn injury on DC subpopulations and their functionality in CARS. We demonstrated severe alterations in splenic DC functions at 10 days post-injury. These perturbations were characterized by a decrease in their capacity to prime T cells via a dysregulation of TLR4 expression, maturation induction and cytokine secretion. We concluded that DCs from burn-injured mice are no longer capable to respond adequately to TLR stimulation, thus leading to endotoxin tolerance-like state following microbial infections.

Material and Methods

Mouse thermal injury model

All experiments were performed on 8-week old male C57Bl/6 mice (Charles River Laboratories, St-Constant, QC, Canada). Prior to the initiation of any procedure, the mice were acclimatized for 1 week to our central animal facility with strictly controlled temperature, relative humidity, and a 12h light/dark cycle. Each cage contained 5 mice, which were fed standard chow (Richmond standard diet, Lab Diet, Richmond, IN, USA) and water *ad libitum*. The Institutional Animal Care Committee reviewed and approved all procedures performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines. Mice were subjected to a well established thermal injury model that was previously described [17,31]. Briefly, mice were anesthetized with pentobarbital (CDMV, St-Hyacinthe, QC, Canada) and the dorsums were shaved. Mice were placed in a custom-insulated mold exposing 20% of

their total body surface area (TBS) and were immersed for 7s in either room temperature water (22°C) for sham burn or in 90°C water to produce a full-thickness burn. This treatment has been shown to cause full-thickness burn with low mortality (< 5%). All animals received by i.p. a mixture of ml 0.9% saline and 0.1mg/kg of buprenorphine (Reckitt and Coleman Pharmaceuticals, Richmond, VA, USA) for fluid resuscitation while a topical antibacterial agent (silver sulfadiazine cream, Smith and Nephew, QC, Canada) was applied on the burned areas.

Dendritic cell isolation

One or ten days after burn injury, mice spleens in each group were individually prepared as single-cell suspensions in 10ml of complete RPMI 1640 (BioMedia, Drummondville, QC, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (BioMedia), 50µM 2-mercapthethanol (Sigma-Aldrich, Oakville, ONT, Canada) and antibiotics (100U/ml penicillin and 100µg/ml streptomycin (Biosource, Montreal, QC, Canada)). DC isolation was done as described in *Methods in Molecular Medicine - Dendritic cell Protocols*, (Stephen P. Robinson & Andrew J. Stagg, Human Press 2001). Briefly, spleen cell suspensions were obtained by digestion at 37°C for 30 min with collagenase mix (1mg/ml Collagenase D and 20µg/ml of DNase I from Roche Molecular Products Laval, QC, Canada) in RPMI-1640 medium 2% of FBS. At the end of incubation, splenocyte suspensions were obtained by tearing apart the splenic matrix on a strainer and kept on ice to prevent DC maturation. Thereafter, erythrocytes were removed by hypertonic lysis (Gey's solution with NH₄Cl), viability determined and total cell numbers counted. Viability of cells was consistently greater than 90%. Spleen cell suspensions (10⁸ total cells) were incubated in 400µL of PBS 0.5% BSA buffer with 200µL heat inactivated normal mouse serum, 100µg/ml of

purified rat anti-mouse CD16/CD32 Fc γ III/II Fc-Block Ab (BD Biosciences Pharmingen, Mississauga, ONT, Canada) and 70 μ L microbead-conjugated hamster anti-mouse CD11c⁺ (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) at 4°C for 15 min. Cells were washed twice and DCs were separated by positive magnetic selection on auto-MACS according to the manufacturer's instructions. The purity of CD11c⁺ cells was consistently greater than 85% as determined using an R-PE-conjugated hamster anti-mouse CD11c MoAb (BD Biosciences Pharmingen) on a FACScan® flow cytometer (Becton Dickinson, Mississauga, ONT, Canada). WinMdi software was used for analysis.

T cell proliferation assay

To evaluate DC cell capacity to prime T cell proliferation at ten days, we use T cell hybridomas BO-97.11 of which their TcRs are specific to OVA peptide (323-339) (Peptides International, Louisville, KY, USA) presented by I-Ab cells. First, we pulsed splenic DCs with different OVA concentrations 0, 3, 30, 300 μ g/ml for 1h. OVA-pulsed splenic DCs were incubated with BO-97.11 T cells at a ratio of 1:4 alone with media or with 1 μ g/ml of LPS Escherichia Coli (O55:B55; Sigma-Aldrich) for 24h. The supernatants were harvested for measurement of IL-2 secretion by BO-97.11 T cells, as an indirect marker of cell proliferation, using an ELISA kit [35]. Purified rat anti-mouse IL-2 and biotin rat anti-mouse IL-2 were purchased at BD Biosciences Pharmingen, streptavidin-POD conjugated from Roche and ABTS substrate (Sigma-Aldrich). All procedures were performed according to the manufacturer's instruction.

Semi-quantitative RT-PCR

At ten days, DCs were washed twice in cold PBS and total RNA was extracted with the RNeasy Mini kit from QIAGEN (Mississauga, ONT, Canada) accordingly by manufacturer's instructions. Random primers (Promega, Madison, WI, USA) and MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, Burlington, ONT, Canada) were used for cDNA synthesis. PCR amplification of the cDNA was performed in a final volume of 50 μ l containing 1.5mM of MgCl₂, 1 unit of GoTaq DNA polymerase (Promega) and 0.5 μ M each of TLR4 primers (Invitrogen). Cycling conditions were 94°C for 30s, 62°C for 30s and 72°C for 30s (Thermocycler Tpersonal, Whatman Biometra, Montreal Biotech Inc., Kirkland, QC, Canada) and the optimum cycle was 41 cycles for TLR4 amplification. The sequence of the specific primers used was for TLR4 forward 5'-CAA GAA CAT AGA TCT GAG CTT CAA CCC-3' and for TLR4 reverse 5'-GCT GTC CAA TAG GGA AGC TTT CTA GAG-3'. For each sample, mRNA was normalized to the corresponding amount of 18S rRNA using the mouse 18S rRNA Primer set kit (Maxim Biotech Inc., San Francisco, CA, USA). The TLR4 signal for each sample was then divided by its corresponding 18S signal. TLR4 and the 18S-probed membranes were analyzed and quantified using a Phosphorimager apparatus (Molecular Dynamics, Amersham Biosciences).

Analysis of TLR4/MD-2

For the experiments investigating TLR4 modulation and maturation of splenic DCs isolated ten days post-trauma, we cultured alone with media or with 1 μ g/ml of LPS in complete RPMI 1640 media at 37°C for the indicated time. Following incubation, cells were trypsinized (0.25% trypsin solution) and washed three times with cold

HBSS (Sigma-Aldrich), 0.1% BSA, 0.01% sodium azide (Sigma-Aldrich). TLR4/MD-2 expression on DC subsets CD8 α^+ and CD8 α^- was evaluated by flow cytometry using biotin anti-TLR4/MD-2, PE-anti-mouse anti-CD4 Abs (eBioscience, San Diego, CA, USA); FITC-conjugated anti-mouse anti-CD8 Ab (eBioscience) and streptavidine-PECy5 (Cedarlane Laboratories, Hornby, ONT, Canada). The isotype control Ab IgG PECy5 (Cedarlane) was used. Following labeling procedures, cells were washed three times with cold HBSS, 0.1% BSA, 0.01% sodium azide and analyzed on FACScan® while WinMdi software was used for the analysis.

Cytokine ELISA

On day ten after burn injury, sham and burn DCs (2×10^5 cells/ml) were stimulated with LPS 1 μ g/ml in complete RPMI 1640 for 24h. Serial dilutions of recombinant cytokine standards and culture supernatants were added to individual wells in triplicate, and were subjected to quantification of the cytokine level of IL-12p40 and IL-10 by using specific ELISA kit. The mouse IL-12/IL-23 (total p40) ELISA kit (eBioscience) was used to quantify IL-12p40 and the mouse IL-10 ELISA ready Set-Go (eBioscience) for IL-10.

Western blot of phosphorylated (activated) MAPK

On day ten following burn injury, splenic DCs (2×10^6 cells) were incubated for 1h at 37°C in microtubes containing media only after what they were exposed to 1 μ g/ml LPS and MAPK activation was evaluated. After 0, 15, 30 and 60 min incubation periods, cells were washed once with PBS 0.5% BSA, lysed in loading buffer and boiled at 95°C for 5 min. Proteins were loaded on a 10% SDS-polyacrylamide gel, separated and transferred onto a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked

overnight with skim milk and probed for overnight at 4°C with desired antibodies. Specific antibodies for the phosphorylated form of p38 MAPK (BioSource, Camarillo, CA, USA), phospho-p46/p54 SAPK/JNK MAPK (Cell Signaling) or p44/42 ERK1/2 MAPK (Cell Signaling) were used. Membranes were then washed three times in TBST and incubated at room temperature with secondary HRP-conjugated anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) for 2h at room temperature. Visualization of the bands was done by chemiluminescence with the ECL⁺ system. Thereafter, membranes probed with phospho-specific antibodies were stripped, blocked and rehybridized with non-phosphorylated anti-p38 (Santa-Cruz Biotechnology), anti-ERK1/2 (Biosource) or anti-JNK Abs (Cell Signaling).

Western blot of endogenous hsp60

Ten days after burn injury, splenocytes were lysed in loading buffer, boiled at 95°C for 5 min and proteins were proceed to western blot as described above. Membranes were stained overnight at 4°C with mouse anti-hsp60 mAb (Stressgen Biotechnologies, BC, Canada). Following three times washing in TBST, membranes were incubated with secondary HRP-conjugated anti-mouse IgG (Santa Cruz) for 1h at room temperature. Visualization of the bands was done by chemiluminescence with the ECL⁺ system. Thereafter, membranes were stripped and reprobed with antibody against mouse actin (A4700; Sigma-Aldrich) to evaluate protein loading in each sample.

Intracellular cytokine detection

At ten days after sham or burn injury, DCs were prepared as previously described and 1×10^6 cells were incubated with 1µg/ml of LPS and 10µg/ml of brefeldin A (Sigma)

for 6h. Cells were then stained for CD11c, CD8 or CD4 expression using FITC-conjugated anti-CD11c (Myltinei Biotec), FITC-conjugated anti-CD8 or FITC-conjugated anti-CD4 Abs (eBioscience). Cells were washed twice with HBSS 0.1%BSA 0.01% Sodium Azide and then fixed for 20 min with 400µl of 2% paraformaldehyde in PBS (pH 7.4) at 4°C. Following fixation, cells were washed once then permeabilized in 200µl of buffer containing 0.1% saponin, 0.1% BSA, and 0.01% sodium azide in PBS. Cytokine staining was done by first pre-treating the fixed and permeabilized cells with 100µL solution of normal human IgG Ab (Sigma) for 10 min at 4°C, to block nonspecific binding. Fixed and permeabilized cells were incubated with PE-labeled rat anti-mouse IL-12 (p40/p70) (BD Pharmingen) for an additional 1h at room temperature. Cells were washed twice with permeabilization buffer, and then resuspended in 100µl of permeabilization buffer. FACScan® flow cytometer was used to detect cytokine expression levels in gated CD11c⁺, CD4⁺ or CD8⁺ DCs subsets and analysis was performed with WinMdi software. PE-labeled isotype control Ab (Cedarlane) was used to judge specific vs nonspecific staining.

Statistical analysis

All data are expressed as mean +/- standard error of the mean (SEM). Data were analyzed by Mann Whitney U test, unpaired T test or by one way ANOVA test and Bonferroni multiple comparison post test using *Graph Pad InStat 3.05* software program (GraphPad Software, San Diego, CA). Differences between groups were considered statistically significant when the probability that they occurred by chance was less than 5%. Each experiment was performed twice or more with a least 5 mice per group.

Results

Increase of DCs in the spleen after thermal injury

We have shown previously that burn injury caused an increase of splenocyte number 10 days post-trauma [17]. Since a proportion of spleen cells are not T or B lymphocytes or macrophages, we have determined the % of CD11c⁺ cells following to burn injury. Analysis of CD11c⁺ splenocyte after burn injury showed a decrease in % of CD11c⁺ cells at day 1 followed by a significant increase at day 10 post-injury (**Fig. 1A**, $p < 0.01$). Transformation in absolute number of CD11c⁺ cells showed at early time following to burn injury (day 1) a decrease of around half in CD11c⁺ DCs (**Fig. 1B**, $p < 0.05$). Later during the CARS stage (day 10) an increase by 2.5 fold in number of splenic CD11c⁺ DCs of burned mice was noted when compared to sham mice (**Fig. 1B**, $p < 0.001$). Overall, burn injury causes a modulation in DCs number which can play an important role in the immune response post-trauma.

DC capacity to prime antigen specific T cells after burn injury

Since DCs are the most potent APC involved in adaptive immunity, we have examined stimulatory capacity for Ag-specific T cells by evaluating indirect parameter such as IL-2 synthesis. To evaluate MHC class II presentation by TLR4-stimulated splenic DCs incubated, we utilised the BO.97.11 hybridoma, which secretes IL-2 upon recognition of the OVA 323-339 peptide in association with I-A^b [35]. DCs from burned mice isolated at 10 days post-injury more efficiently induced IL-2 production by BO97.11 T cells when compared to DCs from sham group (**Fig. 2A**, $p < 0.05$). Considering that many PAMPs are released after burn injury, we wondered if DCs pulsed in the presence of LPS induced optimal IL-2 production.

OVA peptides pulsed DCs in presence of LPS (1 μ g/ml) from burned mice were less efficient than sham DCs in their capacity to induce T cell IL-2 production (Fig. 2B, $p < 0.05$). When compared to sham group, a decrease of 34.7% and 32.9% in IL-2 production by BO97.11 T cells were noted for DCs from burned mice in presence of 30 to 300 μ g/ml of OVA peptide, respectively. Thus, burn injury alone causes an increase in the capacity of DCs to activate T cells. However, a second *in vitro* LPS stimulation causes a reprogramming phenotype of the DCs towards to decrease APC functions observed by reduce T cells activation, suggesting that injury alters signaling pathway of the TLR4.

A common issue of burn injury is the increase of released endogenous activating molecules from necrotic tissues, namely damage-associated molecular pattern molecules which can act as a danger signals. Presence of these endogenous molecules can lead to DC activation like do PAMPs. In humans, burn injury is associated with an increase of later type of molecules as shown with extracellular heat-shock proteins [36]. To address this question in our model, we have determined the level of HSP60 in sera from sham and burned mice. HSP60 from burned mice showed a significant decrease for up to 10 days following injury compared to sham mice (data not shown). However, the enhanced protease activity observed in serum from burn injury needed to be considered in these results [37]. Thus, we have determined the HSP60 expression in splenocytes following burn injury. As expected, we noted a significant increase of HSP60 in splenocyte from burned mice 10 days following the burn injury (Fig. 2C, $p < 0.01$). Since DCs interact with T cells in restricted area and required cognate interaction, which can be influenced by their environment, it is plausible that release of intracellular protein such as HSP60 can influence cells bearing specific

receptor for related molecules. We have sought to determine if endotoxin free recombinant heat-shock protein 60 (rHSP60), a TLR4 ligand, can modulate DC activity isolated from burn injured mice. We observed that OVA peptides pulsed DCs in presence of rHSP60 (5 μ g/ml) from burned mice were less efficient than sham DCs in their capacity to induce T cell IL-2 production (Fig. 2D, $p < 0.05$). Taken together, our results showed that in the presence of a second challenge mediated by TLR4 DCs from burn injured animals less efficiently activate T cells, which can explain the hyporesponsiveness of T cell post-trauma.

Injury decreases LPS-induced TLR4/MD-2 expression on splenic DCs and IL-12 cytokine production

To test whether the inhibitory effect of burn injury on LPS-stimulated DCs were related to decreased TLR4 expression, we have evaluated the TLR4 mRNA by semi quantitative RT-PCR and TLR4 expression on DCs isolated from both groups. TLR4 mRNA in purified splenic CD11c⁺DCs 10 days after burn injury was significantly decreased by 2.3 ± 0.5 fold when in comparison to sham group DCs (Fig. 3A, $p < 0.05$). At protein level, % CD11c⁺DCs expressing TLR4/MD-2 was significantly reduced in DCs isolated from burned mice in comparison to sham group. Splenic CD11c⁺DCs expressing TLR4/MD-2 was significantly decreased 10 days after burn injury with burned mice having $28.4\% \pm 2.3\%$ CD11c⁺/TLR4/MD-2 DCs and sham mice $38.7\% \pm 3.1\%$ CD11c⁺/TLR4/MD-2 DCs (Fig. 3B, $p < 0.05$). Moreover, burned splenic CD11c⁺DCs express lower level of the TLR4/MD-2 receptor compared to sham, as determined by mean fluorescence intensity (MFI) value (Fig 3B, $p < 0.05$).

Three signals generated from TLR-activated DCs direct the differentiation and activation of T helper cell Th1 or Th2 subsets, including the dose of antigen presented (signal 1), the type and degree of co-stimulatory molecule expressed (signal 2), and the type of cytokine secreted (signal 3) [2]. Since burn injury promotes antigen-driven Th2-type responses *in vivo* [26], we have determined if DC perturbations observed after burn injury change TLR4-induced altered co-stimulatory molecule expression and cytokine production. We analyzed the expression of B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) and MHC II on LPS-stimulated (1 μ g/ml) DCs from both sham and burned animals. At basal level CD11c⁺DCs constitutively expressed CD80, CD86 and MHC II (data not shown). In the spleen, the percentage of CD11c⁺DCs showed a trend (statistically not significant different) to increasing MHC II and CD80 associated with lower percentage of CD11c⁺/CD86⁺ (Fig. 4A). Analysis of the percentage of DCs expressing MHCII and co-stimulatory molecules following LPS-activation revealed no significant difference between burn and sham group (Fig. 4A).

The type of cytokine secreted, such as IL-12p40 and IL-10 production, were also determined in LPS-stimulated CD11c⁺DCs from sham and burn injured. In the resting state, the basal amount of IL-12p40 was significantly decreased in burn group (Fig. 4B, $p < 0.05$). After LPS stimulation, a decrease of 50% of IL-12p40 production in burn group (444.7 ± 25.6 pg/ml) was noted in comparison to sham group (846.7 ± 58.1 pg/ml) (Fig. 4B, $p < 0.001$). In order to further assess the cytokine production by DCs, we have determined IL-10 production in supernatant of LPS-stimulated DCs in both groups (Fig. 4B). No change was observed in unstimulated DCs between each group. However, LPS stimulation induced IL-10 production only in DCs from burned animals by 1.6 fold, to reach 173.2 ± 17.9 pg/ml (Fig. 4B, $p < 0.05$). Our results

demonstrate that burn injury causes a decrease in TLR4 expression of DCs associated with a change in the cytokine production towards to an anti-inflammatory cytokine profile.

Burn injury effects on MAP kinase pathway in total splenic DCs.

One potential explanation for the impairment of DCs activity after thermal injury could be related to perturbations in TLR signaling, particularly MAPK pathway which mediate a broad range of physiological processes, including transcription factor activation, maturation and cytokine production cytokines [38-40]. Therefore, we observed the consequence of burn at 10 days post-injury on splenic DCs MAPK activation following TLR4 activation. In order to rule out an over-stimulation of DCs induced by trauma, cells were incubated in the absence of any stimulation for 1h before stimulation. LPS (1µg/ml) exposure enhanced p38 MAPK phosphorylation in DCs from both groups with maximum at 30 minutes. At basal level, a significant increase of p38 MAPK phosphorylation is observed in DCs obtained from burned mice when compared to DCs from sham group (**Fig. 5A**, $p<0.05$). As shown in **Fig. 5A**, CD11c⁺ DCs stimulated with LPS showed an increase of phospho-p38 level for both sham and burned mice. However, no significant difference was observed in p38 MAPK phosphorylation between DCs of both groups following LPS exposure. Since SAPK/JNK is also activated by stress stimuli and is implicated in inflammatory cytokine production in DCs, we determined its activation. As expected, the pattern of SAPK/JNK activation is similar to that of p38 MAPK and no difference was observed between CD11c⁺ DCs from sham and burned mice (**Fig. 5B**). In contrast to the activation of p38 MAPK and SAPK/JNK, ERK1/2 phosphorylation 30 min following LPS-stimulation is significantly less important in DCs from burned mice as compared

to those obtained from sham animals (Fig. 5C, $p < 0.05$). Overall, our results showed that burn injury is not associated with significant altered level of phospho MAPK in total CD11c⁺ DCs.

Burn injury affected selectively CD8 α ⁺CD11c⁺DCs subsets.

The decreased TLR4 expression and the effect on the MAPK pathway in splenic DCs from burned mice prompted us to determine if more subtle changes can be detected within the DCs subsets. At day 10 following burn injury, no significant change was noted in % of either the CD8 α ⁺CD11c⁺DC or the CD8 α ⁻CD11c⁺DC sub-population (Fig. 6A). However, analysis of the TLR4 expression on these subsets revealed that burn injury significantly down-regulated TLR4/MD-2 expression on CD8 α ⁺CD11c⁺DC sub-population (31.3 % \pm 1.6% to 21.4% \pm 1.3% for sham versus burned mice, ** $p < 0.01$) (Fig. 6B). On the contrary, no difference was noted on either CD8 α ⁻CD11c⁺DCs (Fig. 6B). These results demonstrated a selective impact of burn injury on TLR4/MD-2 expression on splenic CD8 α ⁺CD11c⁺DC subsets.

An *et al.* has reported that TLR4 expression is associated with functional DC states [10]. If burn injury causes impairment of TLR4 modulation on CD11c⁺DCs and their subsets, this could lead to a DC dysfunctional state. To verify this purpose, DCs isolated from both sham and burned mouse spleen 10 days post-injury, were stimulated with the optimal stimulatory dose of LPS (1 μ g/ml) for various times. TLR4/MD-2 expression and modulation were analyzed on each DCs subset. LPS stimulation of splenic DCs induced a time related increase of TLR4/MD-2 expression in total splenic DCs from both groups and no significant change occurs after burn injury (data not shown). This TLR4/MD-2 increase was transient and a normal level

of expression was observed at 18h after LPS stimulation (data not shown). Analysis of the DCs subsets showed that CD8 α ⁺CD11c⁺DCs from burned mice failed to up-regulate TLR4/MD-2 expression in response to LPS (Fig. 7A). After 60 and 120 minutes of LPS stimulation, significant decrease of TLR4/MD-2 expression on CD8 α ⁺CD11c⁺DCs in burned mice compared to sham mice was observed (Fig. 7A, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$). Otherwise, on CD8 α ⁻CD11c⁺DCs no change was noted in TLR4/MD-2 expression between each group (Fig. 7B). Our results established that burn injury causes a perturbation in up-regulation of TLR4/MD-2 expression on CD8 α ⁺CD11c⁺DCs following LPS-stimulation without a modification in percentage of CD8 α ⁺CD11c⁺DCs.

Burn injury suppresses IL-12 production by LPS-stimulated CD8 α ⁺CD11c⁺DCs subsets

The CD8 α ⁺ subset of DCs is one of major producers of IL-12 which plays a central role in Th1 response [6]. CD8 α ⁻ DCs can also produce IL-12 but mediate a Th2 response in the presence of IL-10 producing cells in their microenvironment [6]. It is well documented, that burn injury is associated with an increase of the Th2 response on the late phase. Thus we have determined the capacity of both DC subpopulations to produce IL-12 after LPS-stimulation. For this purpose, the intracellular levels of IL-12p40/p70 in both DC subsets were determined. Following LPS stimulation, a significant increase by 1.6 fold in % CD8 α ⁺CD11c⁺DCs positive for intracellular IL-12p40/p70 was noted in sham group (Fig. 8A, 15.0% \pm 0.90% to 24.57% \pm 1.93% for unstimulated versus LPS-stimulated, *** $p < 0.001$). Resting CD8 α ⁺CD11c⁺DCs purified from burned mice have reduced % expression of intracellular IL-12p40/p70 when compared to those isolated from sham group. Their stimulation with LPS led to

an increase of IL-12p40/p70 synthesis (**Fig. 8A**, ** $p < 0.01$), but to lower extent that observed in CD8 α^+ CD11c $^+$ DCs from sham animals (**Fig. 8A**, 24.57 % \pm 1.93 % to 19.23% \pm 1.38% for sham versus burned mice, # $p < 0.05$). The latter significant change represents a 20% decrease in the CD8 α^+ CD11c $^+$ DCs response of burned mice (**Fig. 8A**). In contrast, sham CD8 α^- CD11c $^+$ DCs, either in resting state or after LPS stimulation, have no significant difference, even though a slight increase of IL-12p40/p70 was detected (**Fig. 8B**). With regards to burn CD8 α^- CD11c $^+$ DCs, no difference was detected between sham and burn groups (**Fig. 8B**).

DISCUSSION

Several studies have established that burn injuries are associated with major complications including immunosuppression which can contribute to the development of septicemia [13,14,18]. The contributive factors of the inability of injured patients to resist to potential of fatal infections remain elusive. Many studies have focused on monocyte/macrophage functions after burn injury but little is known about DC's involvement in immune regulation in the post-injury period [38]. In an experimental burn model, Kataranovski et al. [41] have noted an increase of DCs in wound-draining lymph nodes at 24 to 72 hours after injury. More recently, Lederer's group showed that burn injury primed macrophages and dendritic cells for enhanced TLR2 and TLR4-induced IL-1 β , IL-6 and TNF- α production in the spleen [34]. At this time, the consequence of burn injury effect on innate immune system remained elusive since it was demonstrated that these immune perturbations can be protective in an infection model [42]. In a burn injury model, DC functions in adaptive immune responses have never been determined. In trauma patients, including burned patients, it has been suggested that impaired T cell responses after trauma may be related to a decreased promotion of T cell activation by DCs, subsequent to impairment in DC differentiation from monocyte precursors [43].

The present study was undertaken to evaluate the major roles of DCs in the initiation and regulation of immune responses to antigen. Analysis of DC number showed a biphasic modulation characterized by a depletion the day following burn injury and a marked increase at day 10. Depletion at day 1 can be due to the stress response involving the high level of glucocorticoid at this time point [44]. It was observed that DCs, particularly those that are CD8⁺ lymphoid-derived, appear to be lost in the

spleens of septic patients and mice 24h post-trauma [45,46]. This observed depletion of splenic DCs was caused primarily by the loss of immature DCs rather than mature DCs. They found that this depletion of immature DCs was neither LPS nor FasL dependent [45]. The observation that the depletion of DCs was not FasL sensitive is in keeping with the observation of several groups. Interestingly, polymicrobial sepsis seemed to cause divergent effects on splenic DCs and peritoneal DCs. The peritoneal DCs showed a more active response to septic challenge because the capacity of peritoneal DCs isolated from septic mice to trigger T-cell proliferation was enhanced [45]. Therefore, sepsis affected differently DCs isolated from different organs as they are exposed to PAMPs in a different way. In burn sepsis mice, it was observed an impairment of DC development from progenitors, which could also explain the decrease of DCs [47]. However, the exact mechanisms for DC decrease are still unknown. Increase of DCs at 10 days of burn injury is not restricted to DCs, as seen with lymphocytes and myeloid cells [17,48]. This observed modulation in DC numbers suggested that DCs are perturbed by the stress and tissue damage associated with burn injury in mice. As DCs are important cells in effective T cell response, we reasoned that DC number alterations or APC function might explain, in part, the altered T cell-mediated immunity that occurs after injury.

In the presence of released endogenous danger signals following burn injury - released by tissues undergoing stress, damage or abnormal death - DCs are primed [3]. We established that *ex vivo* purified DCs have an increased capacity to stimulate T cells after burn injury. In the model used, the modulation of T cell activation in presence of DCs cannot be due to their capacity to capture and process OVA protein, since we have used an OVA peptide which did not require processing. T cells hybridoma used

in this study are constantly more primed in presence of OVA peptide pulsed-differentiated DC than -undifferentiated DC or fixed DC, although costimulation is not absolutely required [49]. The increased capacity to stimulate T cell suggested us that burn injury may prime DCs *in vivo* into a more mature phenotype associated with a release of inflammatory cytokines. However, our results did show neither a significant increase of the maturation state (data no shown) nor an increase of IL-12p40 production of CD11c⁺ DCs of burned mice that could explain the increased capacity to stimulate T cell. Although DCs respond to primary encounter with PAMPs following burn injury exposure to subsequent pathogens, such as LPS, might render DCs temporarily hyporesponsive to LPS. This phenomenon has been referred to as endotoxin desensitization or LPS tolerance [50]. Interestingly, co-incubation of DCs with LPS decreases their capacity to activate T cells. Importantly, DCs requirement for T cell hybridoma activation was less stringent than those of naïve T cells, suggesting that observed effect of decreasing are under estimated. In future studies, it will be useful to use purified OTII TCR transgenic CD4 T cells, as they are more sensitive to the altered DC antigen-presenting capacity than the T cell hybridomas. Nevertheless, this result can be related to a desensitized state of DCs. We showed after burn injury a decrease of TLR4 in both mRNA and protein expression on total splenic DCs. LPS-activated DCs from burned mice have decreased release of IL-12 and an increased of IL-10 production when compared to DCs isolated from sham mice. Enhanced IL-10 production by TLR4-primed DCs has been demonstrated after TLR restimulation for DCs [51]. Creus *et al.* [52] have reported on liver DCs that TLR4 down-regulation resulted in a decreased response to specific ligands, inducing a reduced or altered activation of hepatic adaptive immune responses. This phenomenon of LPS tolerance was also shown on macrophages or monocytes that

were no longer capable of responding to LPS stimulation [53]. This suggests that injury may have desensitized DCs to TLR4 stimulation after injury in a manner similar to what has been reported for LPS tolerance. For this study, we have used commercially available LPS that could be contaminated with TLR2 bioactive compounds [54]. Since we have used physiological concentrations enabling us to assume that TLR4 is the main receptor involved in our observations. However, a recent study has demonstrated that TLR4 is the main receptor involved in the Gram-negative sepsis, as anti-TLR4 antibodies inhibited lethal endotoxin shock and *E. coli* sepsis [55]. They have shown that TLR2 was not a key player in the pathogenesis of Gram-negative sepsis even though some gram-negative endotoxin species also are sensed by TLR2. Indeed, unlike the TLR4^{-/-} mice, the TLR2^{-/-} mice produced an abundant amount of cytokines during *E. coli* sepsis and had a rapidly fatal clinical course identical to that of wild type mice.

Down regulation of TLR4 seemed to be associated with CARS since Paterson et al. showed no marked injury-induced changes in TLR4 expression levels at 1 day after injury corresponding to SIRS [34]. One day after burn injury, we showed no marked difference in TLR4/MD-2 expression on DCs (data not shown), but a decrease of DC number in spleen was noted. Lyons et al. [56] have demonstrated in injured patients (including major burns), increased IL-10 production which correlated with subsequent septic events. This decreased resistance to subsequent infection may be related to a dysregulation of TLR4 signaling on DCs, since it was observed that IL-10 production may suppress IL-12 production by TLR3 and TLR4 signaling in human DCs [57]. Lederer and co-workers reported a slightly increase of intracellular TLR4/MD-2 expression on F4/80⁺ macrophages at one day following burn injury [58]. However,

by 7 days after burn injury the TLR4 mRNA and intracellular TLR4/MD-2 expression on F4/80⁺ macrophages was clearly increased [58]. They have demonstrated that burn injury primes mouse splenic macrophages and DCs to produce significantly higher levels of the proinflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in response to *in vitro* LPS stimulation within 1 day after injury, with a more pronounced increase in response by 7 days after injury [34]. Moreover, it was demonstrated a higher mortality in burned, but not sham, mice given purified LPS at 7 days after injury, and negligible mortality occurred when injured mice were challenged on day 1 with the same dose of LPS [59]. Based on these observations, the hyperactivity of macrophages was more important in the late phase of the injury. Macrophage's hyperactivity was noted by an increase of MAPK activation and an increased production of cytokines [25]. We showed an increase of p38 activation in freshly isolated DCs at 10 days post-injury suggesting that splenic DCs might have been primed by endogenous ligands present after burn injury. LPS-induced TLR4 DCs stimulation showed an increase of MAPK activation in burn mice compared to sham. In contrast, LPS stimulation induced decreased ERK1/2 MAPK activation in DCs of burned mice. It is surprising that in this study we did not observe the opposite in the profile of MAPK activation since p38 and SAPK/JNK MAPK are implicated in IL-12p40 production and ERK1/2 in IL-10 of DCs. Discrepancy of MAPK activation can be related to maturation/activation of DCs. Indeed, it was demonstrated that SB203580, an inhibitor of p38 MAPK pathway can inhibit or increase TLR4-mediated IL-12p40 production in function of DC activation/maturation [51]. DCs or macrophages increase of IL-10 production mediated by TLR4 stimulation was associated with ERK1/2 MAPK enhancement and p38 MAPK activity [51,52]. Another possibility to explain this observation in MAPK pathway in our model is the

heterogeneity of DCs preparation used. Indeed, by methods used, we isolated all splenic DC subsets, and it is likely that only one of three DC populations found in spleen can be affected by burn injury.

The three conventional DC subsets present in mice spleen are $CD8\alpha^+CD11c^+$, $CD8\alpha^-CD11c^+$ and double negative. All subsets vary in their cytokine profile and possibly, in their functions [1]. Our analysis of $CD8\alpha^-CD11c^+$ at day 10 after burn injury demonstrated no major perturbations of TLR4 expression and IL-12 production at basal level and in their response to LPS. In contrast, we noted for $CD8\alpha^+CD11c^+$ a decrease of TLR4/MD-2 expression in freshly isolated cells and an absence of up regulation expression of this receptor after LPS-induced maturation. Moreover, intracellular IL-12 was decreased after LPS-induced maturation in $CD8\alpha^+CD11c^+$ DCs obtained from burned mice. $CD8\alpha^+$ DCs are mainly found in splenic T cells zones [60] and play a dominant role in cross-priming, cross-tolerance and preferentially induce a Th1-biased response [61]. The Th2-type response to soluble Ags is due to $CD8\alpha^-$ DCs [5,6,62]. Maldonado-Lopez *et al.* [6] have demonstrated that $CD8\alpha^+$ DCs, in contrast to $CD8\alpha^-$ DCs, can produce IL-12 as early as 1h after *in vivo* stimulation and in the apparent absence of any priming. Our results point out that impairment of TLR4 signaling led to decrease IL-12 production of $CD8\alpha^+CD11c^+$ DCs which could explain the decrease of T cell activation and Th1 pro-inflammatory response following thermal injury. After burn injury, adaptive immune response is characterized by Th2 type response [21,26]. O'Sullivan and *al.* have also reported similar findings that major injury leads to a diminished IL-12 production and an increased production of IL-4 and IL-10. This imbalance between Th1 versus Th2 cytokine response has been associated with decreased resistance to infection after burn

injury [21]. Presently, experiments are being conducted in our laboratory to determine if post-maturation DCs are capable of inducing differentiation of both Th1 and Th2 cells. Lower number of each DC represents major limitation and required an important number of mice. For this reason, we also work to develop an *in vitro* model to study the endotoxin tolerance or the post-maturation reprogramming of each DC subsets.

Overall, our study showed a dysfunction of DC subset involving in adaptive immune response after 10 days of burn injury. A better understanding on which DC subset affected and their impaired function can lead to development of new therapeutic avenue to reduce the immunosuppressive state in CARS period. Until today, a tolerance state was defined as a deletion of cell functional activity. However, the term “cellular reprogramming”, previously proposed by Zhang and Morisson [63] to characterize endotoxin tolerance, appears to be the most appropriate one to define the events occurring among circulating leukocytes during critical illness. Our study has shown that burn injury caused a state of reprogramming DC subsets that are no longer capable of responding adequately to any subsequent challenge. Since various populations of DCs are central to the orchestration microenvironment and are involved in the generation of regulatory T cells to preserve its integrity and maintain local homeostasis, a better characterization on the effect of trauma on these populations can results in a better management of secondary response of immune system to injury.

Legend

Figure 1: Burn injury causes an increase of DC number in spleen 10 days post-injury. C57Bl/6 mice were subjected to thermal injury and splenocytes were isolated as described in *Material and Methods* 1 and 10 days post-injury. Dendritic cell percentage (A) and number (B) were evaluated by flow cytometry for both sham and burn mice as described in *Material and Methods*. Data are represented as the mean \pm SEM of four independent experiments (n= 5 mice/group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$; using a Mann-Whitney U test to compare sham vs burn injured mice).

Figure 2: Burn injury decreases DC capacity to prime naive T cells. T cell hybridomas BO-97.11, the TCR of which is specific to ovalbumine peptide (323-339) presented by I-A^b cells, were used to evaluate DC cell capacity to present antigen and induce T cell proliferation. DCs were pulsed with different OVA concentrations 0, 3, 30, 300 μ g/ml alone with media (A) or with LPS (1 μ g/ml) (B) or (D) with rHSP60 (5 μ g/ml). Then OVA-pulsed splenic DCs were co-cultured with BO-97.11 T cells at a ratio of 1:4 for 24h. The supernatants were harvested and IL-2 production by BO-97.11 cells was evaluated by ELISA. Results are presented as mean value \pm SEM of three independent experiments (n= 5 mice/group; * $p < 0.05$, using an ANOVA test with Bonferroni post test to compare sham vs burn injured mice of each OVA concentration) (C) HSP60 expression level in total splenocytes 10 days post-injury. Results are presented as mean value \pm SEM of three independent experiments (n= 3 mice/group; ** $p < 0.01$, using a Mann-Whitney test).

Figure 3: Splenic CD11c⁺DCs have decreased TLR4 mRNA and TLR4/MD-2 protein level after burn injury. RNA was isolated from both sham and burn splenic DCs, and

RT-PCR was performed to evaluate TLR4 gene expression (A) in both sham and burn mice. For each TLR4 RT-PCR, 18S ribosomal RNA was evaluated as a housekeeping gene, as described in *Material and Methods*. Results are expressed as relative mRNA TLR4 expression normalized to 18S RNA of two independent experiments (DCs of $n=7$ mice/group were pooled). Results are presented as mean value \pm SEM of three independent experiments ($n=3$ mice/group; * $p < 0.05$, using a Mann-Whitney test). Percentage of splenic DCs expressing TLR4/MD-2 and the MFI of TLR4/MD-2 on splenic DCs (B) were evaluated by flow cytometry using specific Abs as described in *Material and Methods*. TLR4/MD-2 protein level is presented as mean value \pm SEM of four independent experiments ($n=5$ mice/group, * $p < 0.05$, using a Mann-Whitney U test to compare sham vs burn injured mice). Dotted line – isotype control, the filled curve (grey) – sham and open curve (white) – burn TLR4/MD-2 histogram.

Figure 4: Burn injury induces a decrease of IL-12p40 associated with an increase of IL-10 production without any changes of CMH II, CD86 and CD80 expression of splenic CD11c⁺ DCs. (A) 18h after incubation with LPS (1 μ g/ml) CD11c⁺DCs were labeled using specific Abs as described in *Material and Methods*. FACS results are representative of one experiment of three independent experiments (DCs of $n=7$ mice/group were pooled). The filled curve (grey) – isotype control, the dotted line curve – unstimulated and the open curve (white) – LPS-stimulated histogram. The culture supernatants were subject to quantification of the proteins levels of (B) IL-12p40 and IL-10 by ELISA. Results are presented as mean value \pm SEM of three independent experiments ($n=5$ mice/group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, using an ANOVA test with a Bonferroni post test to compare sham vs burn injured mice)

Figure 5: Burn injury causes an increase in MAPK phosphorylation in LPS-stimulation CD11c⁺DCs. On day 10, splenic CD11c⁺DCs were incubated with 1 µg/ml LPS for the indicated times and p38 (A), SAPK/JNK (B) and ERK1/2 MAPK (C) phosphorylation were measured by Western blot as mentioned in *Material and Methods*. Results are presented of three independent experiments. MAPK phosphorylation level ratio is presented as mean value ± SEM of three independent experiments (DCs of n= 7 mice/group were pooled, * $p < 0.05$, using an unpaired T test to compare sham vs burn injured mice).

Figure 6: Effect of burn injury on TLR4/MD2 expression on CD8α⁺CD11c⁺DCs and CD8α⁻CD11c⁺ sub-population at day 10. Percentage of splenic CD11c⁺DC subsets, termed as CD8α⁺(CD4⁻)CD11c⁺ and CD8α⁻(CD4⁺)CD11c⁺ from both sham or burn mice was evaluated at day 10 post-injury (A). Ten days following burn injury, TLR4/MD-2 expression level on both CD8α⁺(CD4⁻)CD11c⁺ and CD8α⁻(CD4⁺)CD11c⁺ from both sham or burned mice was measured by flow cytometry using specific Abs as described in *Material and Methods*. (B) Results are represented as mean value ± SEM of three independent experiments (n= 7 mice/group; ** $p < 0.01$; using Mann-Whitney U test to compare sham vs burn injured mice). The filled curve (grey) – sham and open curve (white) – burn TLR4/MD-2 histogram.

Figure 7: Inhibition of TLR4 up-regulation following LPS stimulation on CD8α⁺CD11c⁺DC sub-population isolated from burned mice 10 days post-injury. Splenic DCs were cultured with 1 µg/ml of LPS at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for the indicated times. TLR4/MD-2 expression was measured by flow cytometry on

CD8 α^+ (CD4 $^-$)CD11c $^+$ DCs (A) and CD8 α^- (CD4 $^+$)CD11c $^+$ DCs (B) in total splenic DCs as described in *Material and Methods*. Results are presented as mean value \pm SEM of three independent experiments (n= 7 mice/group; * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ using an ANOVA test with a Bonferroni post test to compare sham vs burn injured mice). The filled curve (grey) – sham and open curve (white) – burn TLR4/MD-2 histogram.

Figure 8: Decreased production of IL-12 pro-inflammatory cytokine from LPS-stimulated CD8 α^+ CD11c $^+$ DCs isolated 10 days after burn injury. Intracellular IL-12p40/p70 was evaluated on DC subsets CD8 α^+ (A) and CD8 α^- (B) after LPS (1 μ g/ml) stimulation on both sham and burn mice. Representative FACS plots showing intracellular IL-12p40/p70 on gated CD8 α^+ CD11c $^+$ DCs and CD8 α^- CD11c $^+$ DCs; the numbers in the upper-right quadrants represent the percent-positive staining cells. Results are presented as mean value \pm SEM of three independent experiments (n= 4 mice/group, # $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$, using an ANOVA test with a Bonferroni post test to compare sham vs burn injured mice).

Reference List

1. Liu, Y. J. (2001) Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**, 259-262.
2. Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.
3. Gallucci, S., M. Lolkema, and P. Matzinger (1999) Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* **5**, 1249-1255.
4. Cella, M., A. Engering, V. Pinet, J. Pieters, and A. Lanzavecchia (1997) Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* **388**, 782-787.
5. Maldonado-Lopez, R. and M. Moser (2001) Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. *Semin Immunol* **13**, 275-282.
6. Maldonado-Lopez, R., C. Maliszewski, J. Urbain, and M. Moser (2001) Cytokines regulate the capacity of CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo. *J Immunol* **167**, 4345-4350.
7. Ueno, H., E. Klechevsky, R. Morita, C. Asford, T. Cao, T. Matsui, T. Di Pucchio, J. Connolly, J. W. Fay, V. Pascual, A. K. Palucka, and J. Banchereau (2007) Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* **219**:118-142.
8. Tsan, M. F. and B. Gao (2004) Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* **76**, 514-519.
9. Marshak-Rothstein, A (2006) Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* **6**, 823-835.
10. An, H., Y. Yu, M. Zhang, H. Xu, R. Qi, X. Yan, S. Liu, W. Wang, Z. Guo, J. Guo, Z. Qin, and X. Cao (2002) Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. *Immunology* **106**, 38-45.
11. Takaesu, G., S. Kishida, A. Hiyama, K. Yamaguchi, H. Shibuya, K. Irie, J. Ninomiya-Tsuji, and K. Matsumoto (2000) TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* **5**, 649-658.
12. Hirata, N., Y. Yanagawa, T. Ebihara, T. Seya, S. Uematsu, S. Akira, F. Hayashi, K. Iwabuchi, and K. Onoe (2008) Selective synergy in anti-inflammatory cytokine production upon cooperated signaling via TLR4 and TLR2 in murine conventional dendritic cells. *Mol Immunol* **45**, 2734-2742.
13. O'Sullivan, S. T. and T. P. O'Connor (1997) Immunosuppression following thermal injury: the pathogenesis of immunodysfunction. *Br J Plast Surg* **50**, 615-623.

14. Lederer, J. A., M. L. Rodrick, and J. A. Mannick (1999) The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock* **11**,153-159.
15. Barlow, Y (1994) T lymphocytes and immunosuppression in the burned patient: a review. *Burns* **20**, 487-490.
16. Saffle, J. R., J. J. Sullivan, G. M. Tuohig, and C. M. Larson (1993) Multiple organ failure in patients with thermal injury. *Crit Care Med* **21**,1673-1683.
17. Patenaude, J., M. D'Elia, C. Hamelin, D. Garrel, and J. Bernier (2005) Burn injury induces a change in T cell homeostasis affecting preferentially CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* **77**,141-150.
18. Mannick, J. A., M. L. Rodrick, and J. A. Lederer (2001) The immunologic response to injury. *J Am Coll Surg* **193**,237-244.
19. Efron, P. and L. L. Moldawer (2003) Sepsis and the dendritic cell. *Shock* **20**,386-401.
20. 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**,432-437.
21. 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**,482-490; discussion 490-502.
22. Duan, X., D. Yarmush, A. Leeder, M. L. Yarmush, and R. N. Mitchell. (2008) Burn-induced immunosuppression: attenuated T cell signaling independent of IFN-gamma- and nitric oxide-mediated pathways. *J Leukoc Biol* **83**,305-313.
23. Daniel, T., M. Alexander, W. J. Hubbard, I. H. Chaudry, M. A. Choudhry, and M. G. Schwacha (2006) Nitric oxide contributes to the development of a post-injury Th2 T-cell phenotype and immune dysfunction. *J Cell Physiol* **208**,418-427.
24. Schwacha, M. G. and I. H. Chaudry (2002) The cellular basis of post-burn immunosuppression: macrophages and mediators. *Int J Mol Med* **10**, 239-243.
25. Alexander, M., T. Daniel, I. H. Chaudry, and M. G. Schwacha (2004) MAP kinases differentially regulate the expression of macrophage hyperactivity after thermal injury. *J Cell Physiol* **201**,35-44.
26. Guo, Z., E. Kavanagh, Y. Zang, S. M. Dolan, S. J. Kriynovich, J. A. Mannick, and J. A. Lederer (2003) Burn injury promotes antigen-driven Th2-type responses in vivo. *J Immunol* **171**,3983-3990.
27. 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* **12**,39-45.
28. Toliver-Kinsky, T. E., C. Y. Lin, D. N. Herndon, and E. R. Sherwood (2003)

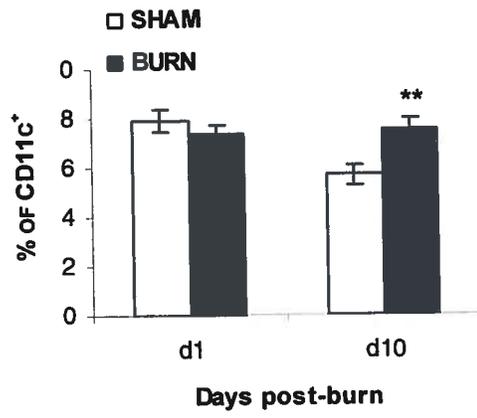
Stimulation of hematopoiesis by the Fms-like tyrosine kinase 3 ligand restores bacterial induction of Th1 cytokines in thermally injured mice. *Infect Immun* **71**,3058-3067.

29. Toliver-Kinsky, T. E., W. Cui, E. D. Murphey, C. Lin, and E. R. Sherwood (2005) Enhancement of dendritic cell production by fms-like tyrosine kinase-3 ligand increases the resistance of mice to a burn wound infection. *J Immunol* **174**, 404-410.
30. Bohannon, J., W. Cui, R. Cox, R. Przkora, E. Sherwood, and T. Toliver-Kinsky (2008) Prophylactic treatment with fms-like tyrosine kinase-3 ligand after burn injury enhances global immune responses to infection. *J Immunol* **180**, 3038-3048.
31. Jobin, N., D. R. Garrel, and J. Bernier (2000) Increased burn-induced immunosuppression in lipopolysaccharide-resistant mice. *Cell Immunol* **200**, 65-75.
32. McManus, A. T., /Mason, A. D. Jr, /McManus, W. F. and Pruitt, B. A. Jr (1985) Twenty-five year review of Pseudomonas aeruginosa bacteremia in a burn center. *Eur J Clin Microbiol* **4** (2), 219-223.
33. Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H. , Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., Akira, S. (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol*, **162** (7), 3749-3752.
34. Paterson, H. M., T: J. Murphy, E. J. Purcell, O. Shelley, S. J. Kriynovich, E. Lien, J. A. Mannick, and J. A. Lederer (2003) Injury primes the innate immune system for enhanced Toll-like receptor reactivity. *J Immunol* **171**, 1473-1483.
35. Hugo, P. , Kappler, J. W., Godfrey, D. I., Marrack, P. C. (1992) A cell line that can induce thymocyte positive selection. *Nature* **360**, 679-682.
36. Ogura, H., N. Hashiguchi, H. Tanaka, T. Koh, M. Noborio, Y. Nakamori, M. Nishino, Y. Kuwagata, T. Shimazu, and H. Sugimoto (2002) Long-term enhanced expression of heat shock proteins and decelerated apoptosis in polymorphonuclear leukocytes from major burn patients. *J Burn Care Rehabil* **23**,103-109.
37. Rund, T. E., P. Kierulf, H. C. Godal, S. Aune, and A. O. Aasen (1984) Studies on pathological plasma proteolysis in severely burned patients using chromogenic peptide substrate assays: a preliminary report. *Adv Exp Med Biol* **167**,449-454.
38. Rescigno, M., M. Martino, C. L. Sutherland, M. R. Gold, and P. Ricciardi-Castagnoli (1998) Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med* **188**,2175-2180.
39. Puig-Kroger, A., M. Relloso, O. Fernandez-Capetillo, A. Zubiaga, A. Silva, C. Bernabeu, and A. L. Corbi (2001) Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* **98**,2175-2182.

40. Arrighi, J. F., M. Rebsamen, F. Rousset, V. Kindler, and C. Hauser (2001) A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J Immunol* **166**, 3837-3845.
41. Kataranovski, M., T. Nikolic, M. Velickovic, M. Colic, N. Pejnovic, and J. Vojinovic (2000) Increased activity of lymph node cells in experimental thermal injury: changes in accessory cells in injured area-draining lymph nodes. *Burns* **26**,525-534.
42. Maung, A. A., S. Fujimi, M. P. MacConmara, G. Tajima, A. M. McKenna, A. J. Delisle, C. Stallwood, A. B. Onderdonk, J. A. Mannick, and J. A. Lederer (2008) Injury enhances resistance to Escherichia coli infection by boosting innate immune system function. *J Immunol* **180**,2450-2458.
43. Zhang, P. Z., F. J. Qin, C. X. Ma, H. Su, D. N. Yu, and C. Li (2007) [Characterization and biological significance of peripheral blood dendritic cell subsets in patients with severe burn]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **87**,2275-2277.
44. D'Elia, M., J. Patenaude, C. Hamelin, D. R. Garrel, and J. Bernier (2005) Corticosterone binding globulin regulation and thymus changes after thermal injury in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**,E852-860.
45. Ding Y., Chung C-S., Newton S., Chen Y., Carlton S., Albina J., and Ayala A. (2004) Polymicrobial sepsis induces different effects on splenic and peritoneal dendritic cell function in mice. *Shock* **22**(2), 137-144.
46. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, Cobb JP, Coopersmith C, Karl IE. (2002) Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol*. **168**,2493-2500.
47. Muthu, K., He, L. K., Melstrom, K., Szilagyi, A., Gamelli, R. L. and Shankar, R. (2008) Perturbed bone marrow monocyte development following burn injury and sepsis promote hyporesponsive monocytes, *J Burn Care Res*, **29**, 12-21.
48. Noel, J. G., X. Guo, D. Wells-Byrum, S. Schwemberger, C. C. Caldwell, and C. K. Ogle (2005) Effect of thermal injury on splenic myelopoiesis. *Shock* **23**,115-122.
49. Met, O., S. Buus, and M. H. Claesson (2003) Peptide-loaded dendritic cells prime and activate MHC-class I-restricted T cells more efficiently than protein-loaded cross-presenting DC. *Cell Immunol* **222**,126-133.
50. Randow, F., Syrbe, U., Meisel, C., Krausch, D., Zuckermann, H., Platzer, C., Volk, H. D. (1995) Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J Exp Med*, **181** (5),1887-1892.
51. Yanagawa, Y. and K. Onoe (2007) Enhanced IL-10 production by TLR4- and TLR2-primed dendritic cells upon TLR restimulation. *J Immunol* **178**,6173-6180.
52. De Creus, A., M. Abe, A. H. Lau, H. Hackstein, G. Raimondi, and A. W.

- Thomson (2005) Low TLR4 expression by liver dendritic cells correlates with reduced capacity to activate allogeneic T cells in response to endotoxin. *J Immunol* **174**,2037-2045.
53. Fan, H. and J. A. Cook (2004) Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res* **10**,71-84.
 54. Hirschfeld, M., Ma, Y., Weis, J. H., Vogel, S. N., Weis, J. J. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. (2000) *J Immunol* **165**, 618-622.
 55. Roger, T., Froidevaux, C., Le Roy, D. and al., Protection from lethal gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like receptor 4 (2009) *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 2348-2352.
 56. 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. *Ann Surg* **226**,450-458; discussion 458-460.
 57. Re, F. and J. L. Strominger (2004) IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *J Immunol* **173**,7548-7555.
 58. Maung, A. A., S. Fujimi, M. L. Miller, M. P. MacConmara, J. A. Mannick, and J. A. Lederer (2005) Enhanced TLR4 reactivity following injury is mediated by increased p38 activation. *J Leukoc Biol* **78**,565-573.
 59. Murphy, T. J., H. M. Paterson, S. Kriynovich, Y. Zang, E. A. Kurt-Jones, J. A. Mannick, and J. A. Lederer (2005) Linking the "two-hit" response following injury to enhanced TLR4 reactivity. *J Leukoc Biol* **77**,16-23.
 60. Neuenhahn, M. and D. H. Busch (2007) Unique functions of splenic CD8alpha+ dendritic cells during infection with intracellular pathogens. *Immunol Lett* **114**,66-72.
 61. Steinman, R. M., M. Pack, and K. Inaba (1997) Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev* **156**,25-37.
 62. Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain, and M. Moser (1999) CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* **189**,587-592.
 63. Fukao, T. and S. Koyasu (2003) PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol* **24**, 358-363.

A



B

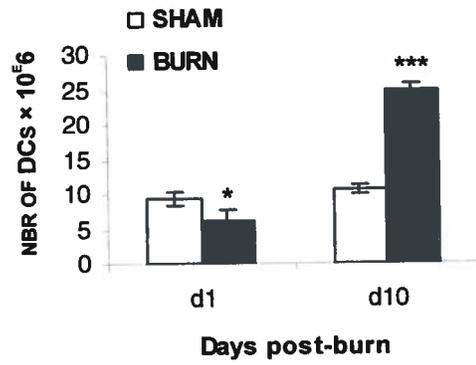


Figure 1

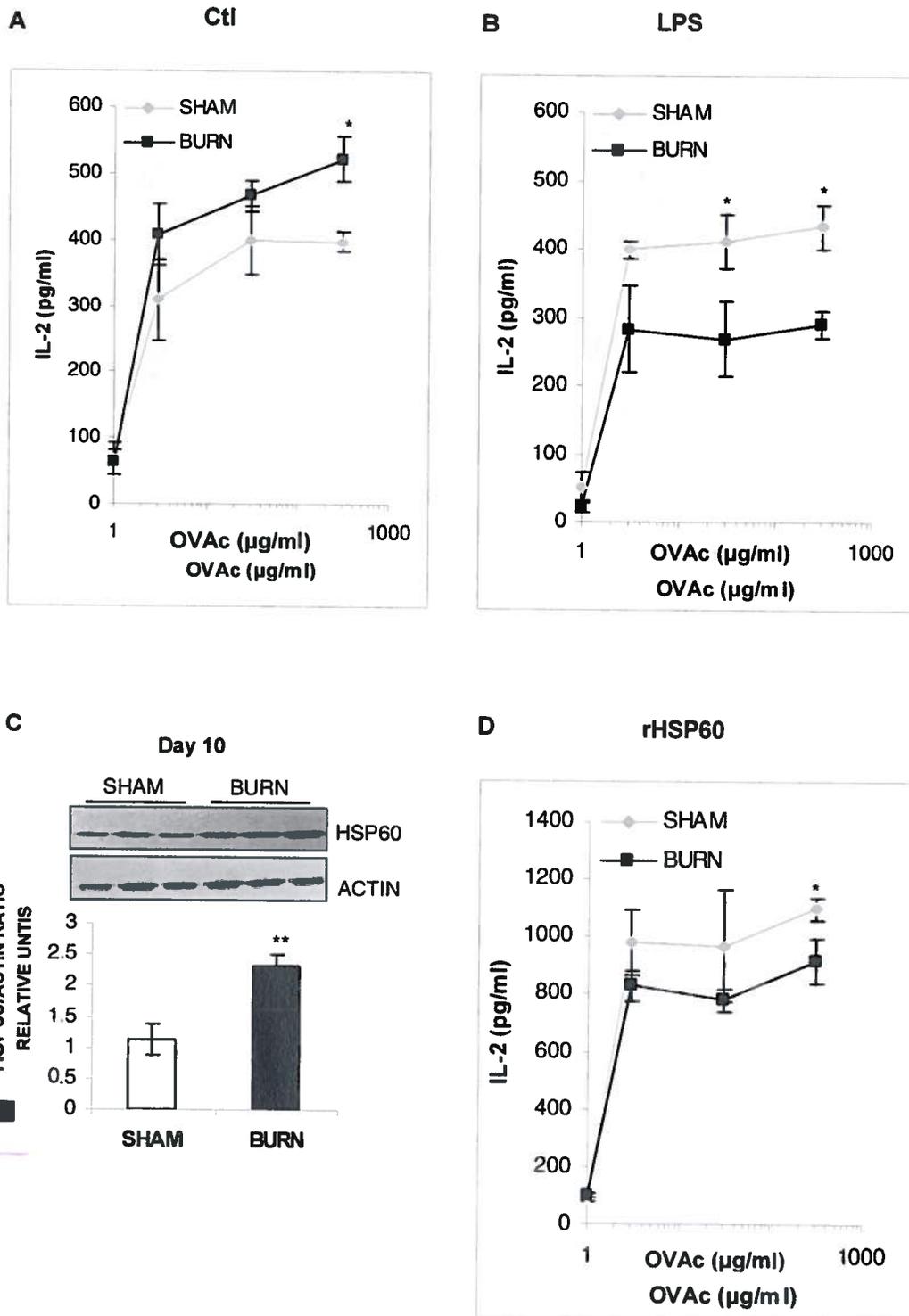


Figure 2

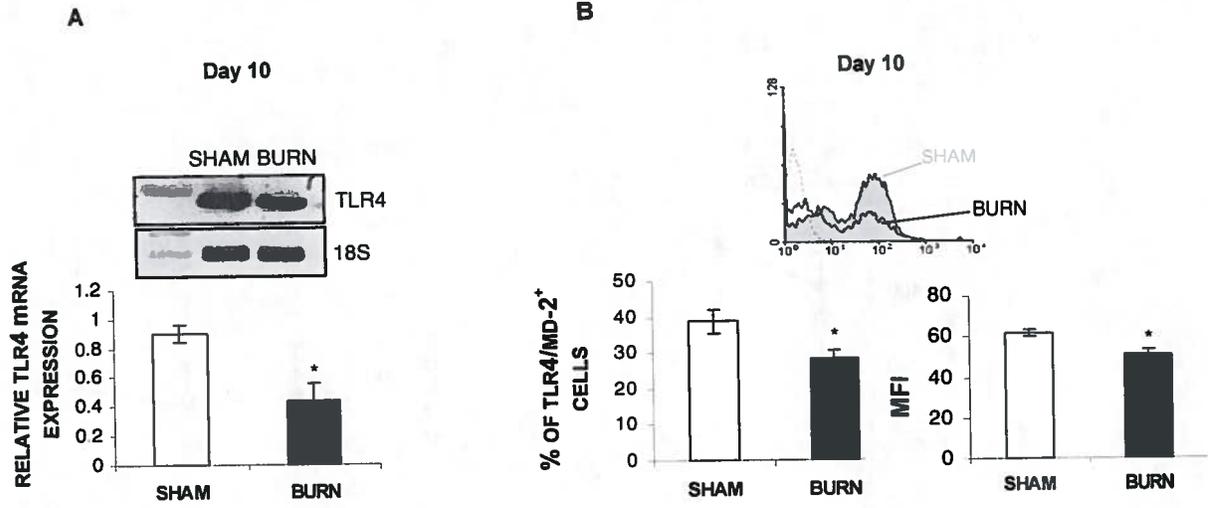


Figure 3

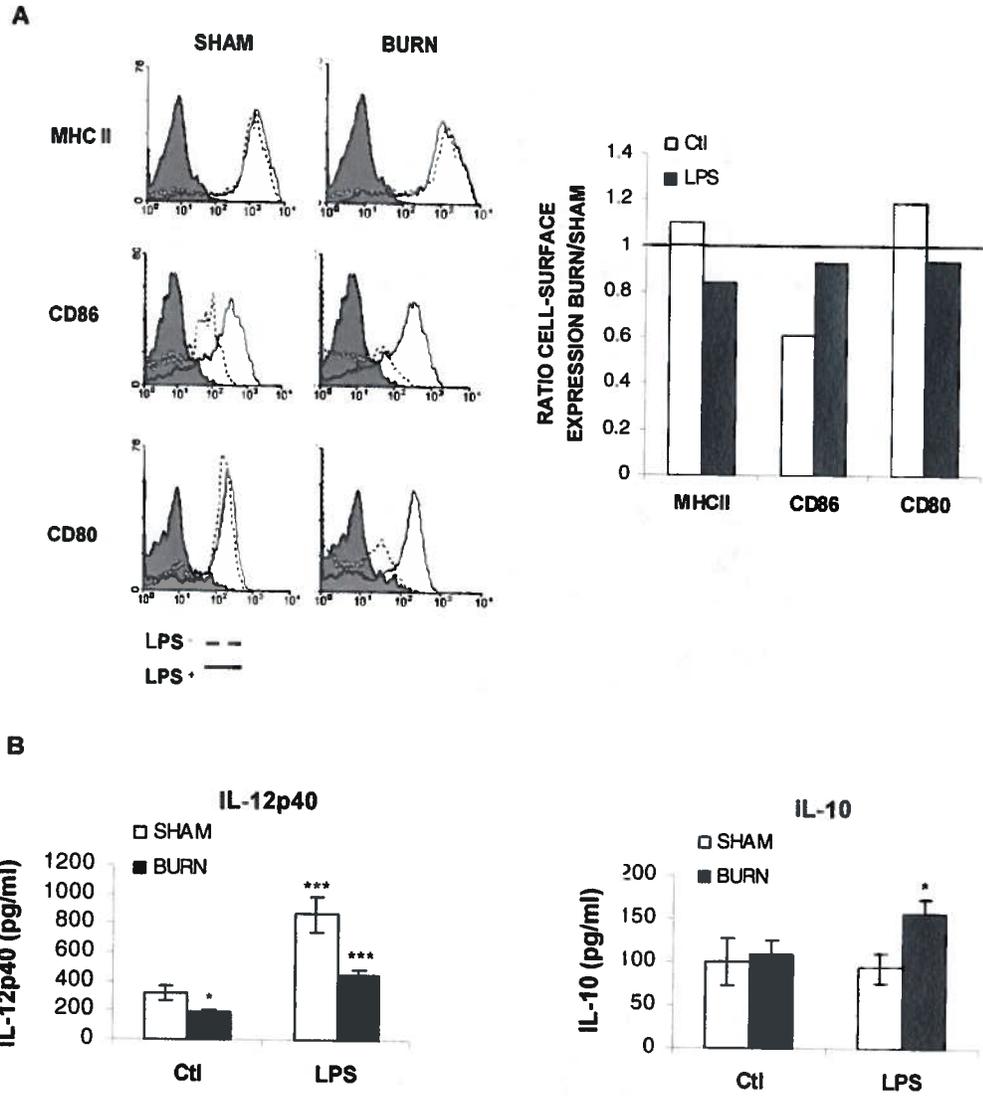


Figure 4

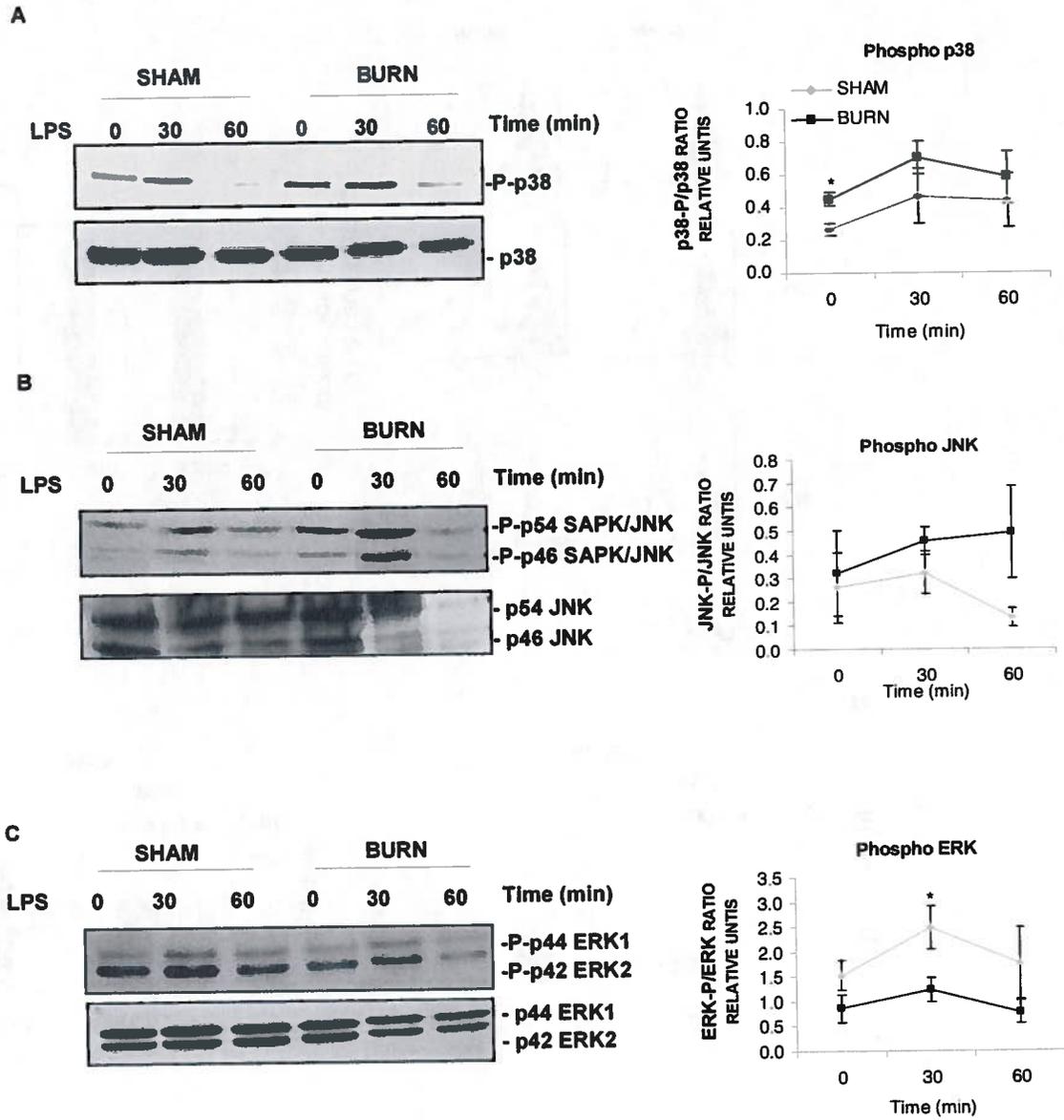


Figure 5

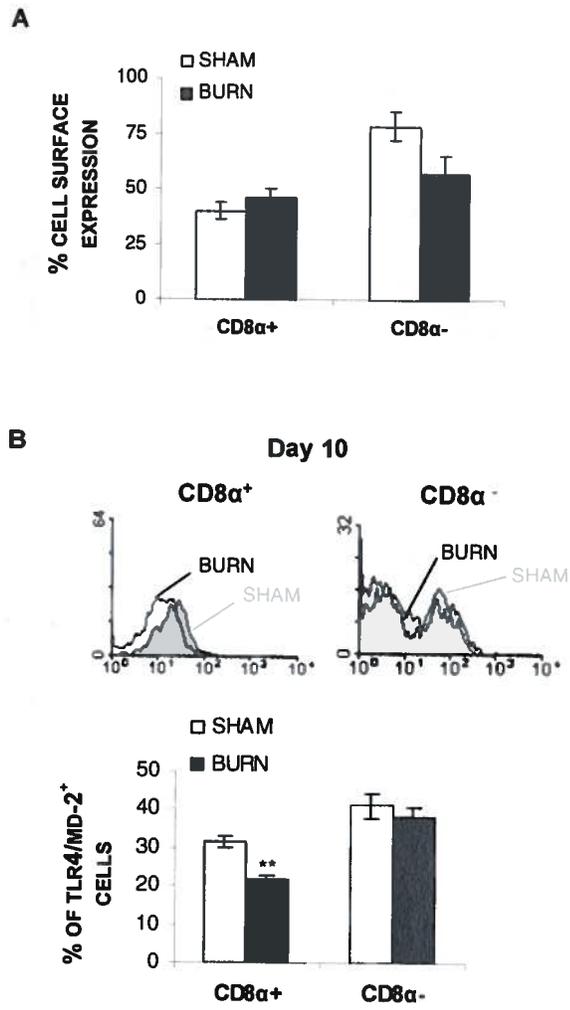


Figure 6

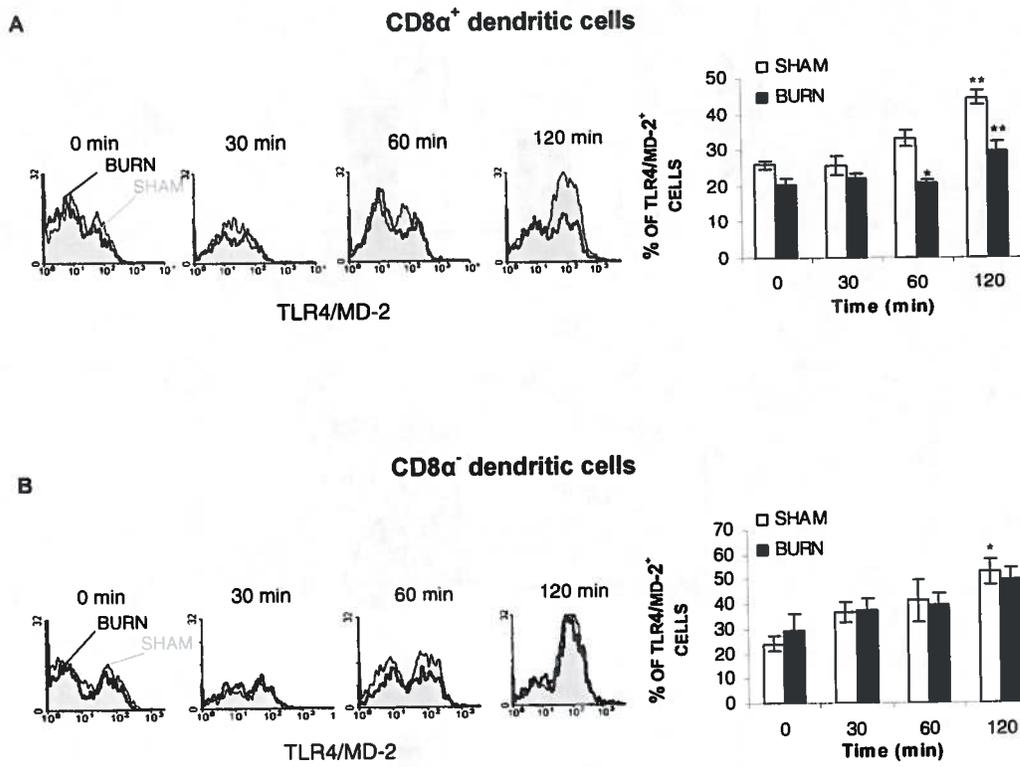


Figure 7

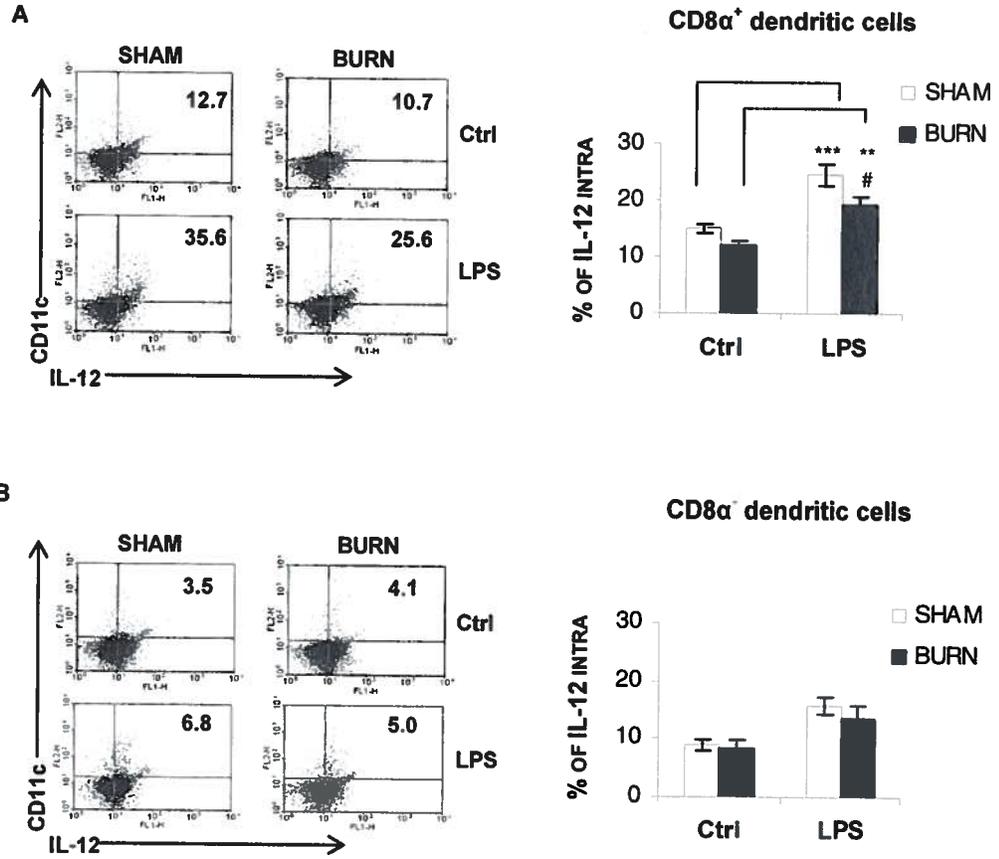


Figure 8

CHAPITRE 4 : ARTICLE II

Mise en contexte

Une activation inappropriée des CD, telle qu'observée suivant la brûlure sévère, peut engendrer une reprogrammation des CD vers un état de non réponse. Cette reprogrammation des leucocytes suivant un choc septique s'apparente au phénomène de tolérance aux endotoxines et peut être associée à la grande susceptibilité que présentent les patients septiques face aux infections nosocomiales. Il a été démontré que cet état de non réponse observé suivant la phase SRIS peut être mimée *in vitro*, en prétraitant pendant 24 heures des cellules avec du LPS, avant de les stimuler de nouveau avec le même activateur (Cavaillon et Adib-Conquy, 2006). Les mécanismes responsables de l'induction de tolérance ont été étudiés chez les monocytes/MAC au niveau des voies de signalisation des TLRs. La tolérance aux LPS induit une diminution de la transduction du signal du TLR4 observée par une suppression de l'activation de protéines clés de la cascade intracellulaire. Il a été observé une inhibition de l'activation de la protéine MyD88 (Janssens et al., 2002), des protéines IRAK (IRAK4 et IRAK-1) (Burns et al., 2003), des MAP kinases (p38, JNK, ERK1/2) (Medvedev, Kopydlowski et Vogel, 2000) et de la transactivation des facteurs de transcription (NF- κ B, AP-1) (Medvedev, Kopydlowski et Vogel, 2000; Wahlstrom et al., 1999). L'activation de molécules inhibitrices telles qu'IRAK-M, des protéines de la famille SOCS, TOLLIP ou la phosphatase MKP-1 sont également impliquées dans l'induction de la tolérance aux LPS chez les MAC (Janssens et Beyaert, 2003). De part l'absence de lignées cellulaires immortalisées de CD et de leur complexité quant à l'isolation, peu d'études portent sur la tolérance des CD aux endotoxines. Récemment, il a été démontré que les CD différenciées *in vitro* à partir de précurseurs de la moelle osseuse, en présence de Flt-3L, représentent un excellent modèle d'étude pour les CD.

Ainsi, nous voulions examiner si :

1. La transduction du signal via le TLR4 des FLDCs induit une activation intracellulaire semblable à celle notée chez les CD spléniques ;
2. La tolérance aux LPS *in vitro* des FLDCs engendre des changements au niveau de l'activation des médiateurs intracellulaires du TLR4 ;
3. L'induction de la tolérance aux LPS implique l'activation de la phosphatase MKP-1 chez les FLDCs.

Résumé français

LPS activation of Flt-3L derived dendritic cells upon first stimulation and during endotoxin tolerance.

Patenaude Julie*, Bernier Jacques*

* INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec

Le facteur de croissance hématopoïétique du ligand de la tyrosine kinase semblable aux FMS-3 (Flt-3L) est utilisé pour la différenciation des précurseurs de la moelle osseuse en CD_s (les FLDCs). Bien que Flt-3L présente des effets bénéfiques dans le rétablissement de la réponse immunitaire acquise suivant un traumatisme, peu d'études ont élucidé les caractéristiques de ces FLDCs. Cette étude a permis de caractériser les changements phénotypiques des FLDCs lorsque stimulées une première fois avec du LPS et après induction de la tolérance aux LPS (initiée par une stimulation répétée avec ce même activateur). La population de FLDCs CD11c^{high} obtenue regroupait deux sous-populations distinctes : les FLDCs CD24^{high} et les FLDCs CD11b^{high}, semblables aux CD_s CD8α⁺ et les CD_s CD8α⁻ présentes dans la rate de souris. Une stimulation de leur TLR4 (LPS) a causé une hausse de l'expression du TLR4/MD-2, une activation des trois MAP kinases (p38, SAPK/JNK, ERK1/2) ainsi qu'une translocation de la sous-unité p56/RelA du complexe NF-κB dans le noyau des cellules. L'activation du TLR4 a également induit la maturation des FLDCs, observée par une hausse de l'expression des molécules de co-stimulation (CD80, CD86 et CD40) et la production d'IL-12p40. Les FLDCs stimulées aux LPS produisaient de l'IL-10, mais à des niveaux moindres que ceux observés pour l'IL-12p40. À l'opposé, l'induction de tolérance aux LPS altère la voie d'activation du TLR4 initiant une nouvelle reprogrammation des FLDCs. Nous avons observé que la tolérance aux LPS inhibe l'augmentation de l'expression du TLR4/MD-2 et des niveaux de phosphorylation de la p38 MAPK et de la SAPK/JNK MAPK. De paire avec cette observation, l'induction de la tolérance aux LPS chez les FLDCs a induit une baisse significative de la production d'IL-12p40. Contrairement à la p38 et la SAPK/JNK MAPK, une stimulation aux LPS a induit une hausse de la forme phosphorylée de l'ERK1/2 MAPK et une augmentation significative d'IL-10 chez les FLDCs tolérantes. Outre une suppression de la phosphorylation des MAP kinases, la

tolérance aux LPS chez les FLDCs est la résultante d'une diminution de la translocation de la sous-unité p65/RelA du complexe NF- κ B dans le noyau des cellules. Nous avons également démontré que l'induction de tolérance aux LPS est associée à une augmentation de la phosphatase MKP-1 chez les FLDCs en comparaison avec le groupe témoin. Nous proposons que l'expression de MKP-1 est impliquée dans l'inhibition de l'activation de la p38 MAPK et la diminution d'IL-12p40 produite par les FLDCs tolérantes. Nous concluons que l'utilisation des FLDCs comme modèle d'étude est efficace quant à la caractérisation de nouveaux mécanismes impliqués dans l'induction de tolérance des CD.

Manuscrit soumis pour révision dans *Journal of Leukocyte Biology*

Contribution des auteurs

J'ai réalisé toutes les expériences décrites dans cet article ainsi que l'analyse. J'ai écrit ce manuscrit en collaboration avec le Dr Bernier.

**LPS ACTIVATION OF FLT-3L DERIVED DENDRITIC CELLS UPON FIRST
STIMULATION AND DURING ENDOTOXIN TOLERANCE**

LPS activation of Flt-3L derived dendritic cells upon first stimulation and during endotoxin tolerance.

Patenaude Julie*, Bernier Jacques*

* INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec

Address for correspondence and reprint requests:

INRS-Institut Armand-Frappier

531 boul. des Prairies

Laval (Québec) H7V 1B7

jacques.bernier@iaf.inrs.ca

Tél.: (450)687-5010

Fax : (450)686-5566

Key Words:

Dendritic cells, Fms-Like tyrosine kinase-3 ligand, Endotoxin tolerance, MAPK, TLR,

Abstract

Fms-like tyrosine kinase-3 ligand (Flt-3L) is a hemopoietic cytokine that stimulates the differentiation of bone marrow cells into dendritic cells (DCs). Despite their beneficial use, the characteristics of these culture-derived DCs need further elucidation. In this study, we described the phenotypical characteristics of a Flt-3L-dependant DC culture (FLDC) system following a first LPS stimulation, corresponding to the inflammatory response, and a second LPS stimulation, related to the LPS tolerance induction. Our conventional CD11c^{high}-FLDC was divided into two populations termed as CD24^{high} and CD11b^{high}, which represent respectively the putative lymphoid (CD8α⁺ equivalent) and myeloid (CD8α⁻ equivalent) related subsets *in vivo*. First LPS stimulation has caused an up regulation of the toll-like receptor-4 (TLR4)/MD-2 expression, activation all three MAPK families (p38, SAPK/JNK and ERK1/2) and an enhancement of NF-κB complex translocation into nucleus. TLR4 priming with LPS has also induced an increasing of all maturation marker expression on FLDCs which correlated with an exhibited increase of IL-12p40 production and, to a lesser level IL-10 production. In contrast, tolerant FLDCs, caused by a second LPS exposure, inhibited TLR4/MD-2 up-regulation associated with an inhibition of both p38 and SAPK/JNK MAPK. Thus, the decrease p38 MAPK and SAPK/JNK MAPK activation might be responsible for the observed impairment of IL-12p40 production. Endotoxin tolerance of FLDCs was also associated with a decrease of NF-κB complex translocation to nucleus. In contrast, LPS tolerance has caused an enhanced ERK1/2 activation that could be related to the increase IL-10 production in tolerant FLDCs. Additionally, we have also demonstrated that LPS-tolerance of FLDCs was associated with an increase of the

MKP-1 phosphatase expression, which may be implicated in the decreased p38, SAPK/JNK MAPK activation and IL-12p40 production.

Introduction

Dendritic cells (DCs) are professional antigen-presenting cells (APC) and many studies have demonstrated their importance in the immune response, because of their unique ability to affect T cell fate, as well as tolerance¹. Upon encounter of pathogens through their Toll-like receptors (TLRs), they become activated, undergo major phenotypic and functional changes, and produce large amounts of pro-inflammatory cytokines (IL-12p40/70, TNF- α , IL-1 β , IL6 and type I IFN)^{2,3}. For example, the TLR4 ligand LPS activates NF- κ B and MAPK family members, including p38, JNK and ERK which regulate the induction of pro-inflammatory cytokines and maturation state of DCs⁴. This maturation changes following TLR priming result in an increase of MHC class I and class II and costimulatory molecules such as CD86 and CD80 expression. This increased maturation markers provide the first two signals for efficient T cell activation and proliferation^{4,5}. Mature DCs secrete cytokines, such as IL-12, TNF- α , IL-6, which polarize T helper (Th) cells toward Th1 or Th2 response, and represent the third signal for induction of efficient T cell immunity⁶. Three functionally distinct subsets can be defined in steady-state mouse spleen that includes the plasmacytoid-DC (pDC), CD8 α^+ - and CD8 α^- -conventional DCs (cDCs)⁴. The CD8 α^+ DCs were reported to be mainly seated in the T cell zone of spleen which confers them the unique ability to stimulate a CD4⁺ T cells to a Th1-response by their predominant production of IL-12^{7,8}. In contrast, CD8 α^- DCs were associated with a Th2-type response as they produce large amounts of IL-4 and IL-10. Depending of the context of their activation, DCs have the capacity to determine whether a T cell activated by a danger signal will become productive or tolerant.

Endotoxin tolerance is defined as a reduced capacity of the host (*in vivo*) or of cultured leukocytes (*in vitro*) to respond to lipopolysaccharides (LPS) activation following a subsequent exposure to this stimulus⁹. LPS tolerance is thought to be an adaptative response that tends to limit the overwhelming inflammation, which occurs during bacterial infection. Endotoxin tolerance may however favour subsequent infections in survivors of septic shock. Many studies using monocytes/macrophages have investigated the phenomenon of endotoxin tolerance. It has been postulated that LPS tolerance occurs through negative regulation of TLR's intracellular signal pathway that are responsible for the diminished pro-inflammatory cytokine synthesis. Endotoxin tolerance was associated with either an up-regulation of either Src homologue 2 containing inositol phosphatase (SHIP), or IL-1R-associated kinase-M (IRAK-M), or suppressor of cytokine signal (SOCS family protein) or mitogen-kinase phosphatase-1 (MKP-1) of tolerant macrophages⁹. Nomura *et al.* have also showed that LPS tolerance was associated with decreased cell surface TLR4/MD-2 expression on mouse macrophages¹⁰. In contrast, other studies performed with human PBMC or monocytes, demonstrated no changes of TLR4 cell surface expression following LPS tolerance^{11,12}. Thus, the hyporesponsiveness to secondary LPS challenge appears to be attributable to the suppressed intracellular pathway and not only by the down-regulation of TLRs. LPS-primed tolerant macrophages were also associated with an increase of anti-inflammatory cytokine production, such as IL-10 and TGF- β ¹³.

The DCs also play central role in establishing and maintaining immune tolerance. One group studied T cell tolerance induction by DCs and demonstrated, in the presence of LPS and IL-10, that DCs expressed higher levels of inhibitory cell surface receptor, namely LIR-2 (leukocyte immunoglobulin-like receptor-2), diminished

costimulatory molecules and pro-inflammatory cytokine production¹⁴. Our laboratory has also demonstrated a phenomenon of tolerance induced by DCs from burned mice. We have observed, following LPS stimulation, that burned splenic DCs presented dysregulation in their capacity of T-cell activation, decreased IL-12 production and enhanced IL-10 (Patenaude and *al.*, observation unpublished). Sherwood et *al.* demonstrated that *in vivo* endotoxin tolerance could be reversed by Fms-like tyrosine kinase-3 ligand (Flt-3L) administration of burned mice through the mobilization, differentiation and tissue expansion of DC populations¹⁵. Flt-3L treatments prevented burn associated impairments in INF- γ and IL-12 production. However, the implicated mechanisms of DCs in endotoxin tolerance are still poorly understood.

DC-biology *in vitro* experimentation is difficult for a number of reasons, such as the small amount of cells following isolation, all heterogeneity, short life span, and more. Using Flt-3L as a hemopoietic growth factor for DC differentiation (called FLDCs) is a desirable alternative for *in vitro* DC-biology research. The advantages of FLDCs include the ability to generate two DC populations which possess lymphoid organ resident DC characteristics, when compared to the common GM-CSF/IL-4 DCs (GM-DCs)¹⁶. Even though GM-CSF cytokine provided a good way to differentiated bone marrow cells into large numbers of DCs for further studies, those cells do not show the heterogeneity of *in vivo* cDCs¹⁶. Both Xu and Naik's studies have demonstrated that FLDCs obtained from *in vitro* differentiation produced three DC subsets; B220⁺, CD24^{high}CD11b^{low} DCs, and CD24^{low}CD11b^{high}¹⁶. These three FLDCs share similar characteristics to those steady-state splenic pDCs, CD8 α ⁺ cDCs and CD8 α ⁻ cDCs respectively. They express a panel of the TLR family receptors, up-regulate their costimulatory molecules (CD86 and CD40) and produce different cytokines (IL-

12p40, IL-12p70, IFN- α , RANTES and MIP1- α) in response to specific ligands^{16;17;18}. FLDC subsets can induce proliferation of naive CD8⁺ and CD4⁺ T cells similarly to the DC counterparts¹⁸. FLDCs may be the ideal *in vitro*-derived DC subtype for enlarging the knowledge of DCs in many applications such as cancer, infection and immunosuppression, such as following a burn injury. Therefore, it is essential to characterise the mechanisms regulating their activation and their functions following LPS stimulation.

In this study, we investigated the mechanisms underlying FLDC activation during the inflammatory process as well as in LPS tolerance induction. For the inflammatory process, we let naive FLDCs in media only for the first 18 hours of stimulation while the tolerant FLDCs were exposed to LPS, for endotoxin tolerance. Then, we proceeded to LPS stimulation for TLR4 priming. We analyzed the TLR4 expression and its related intracellular pathway (MAPK, NF- κ B, maturation and cytokines) during first stimulation toward induction of endotoxin tolerance. We also identified a new role of an inhibitory intracellular protein, named MKP-1, in the tolerant FLDCs. This study provides essential findings of how FLDCs are activated following first LPS stimulation or after tolerance induction. It also described their similarities to conventional DCs (cDCs) obtained *in vivo* and their unique potential for further DC studies.

Material and Methods

Generation of DCs

FLDCs were generated from male C57Bl/6 mice (8-12 wk of age) (Charles River Laboratories, St-Constant, QC, Canada) as described¹⁸⁻²⁰, with minor modifications. Briefly, BM cells were isolated by flushing femur and tibia from mice with 3ml of PBS supplement with 2% heat-inactivated FBS (BioMedia, Drummondville, QC, Canada). The BM cells were resuspended in Gey's solution with NH₄Cl for 3min to lyse RBC. Cells were washed twice in 10ml of complete RPMI 1640 (BioMedia) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (BioMedia), 50 μ M 2-mercapthethanol (Sigma-Aldrich, Oakville, ONT, Canada) and antibiotics (100U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (Biosource, Montreal, QC, Canada)). BM cells were cultured at 2×10^6 cells/ml in 6-well plates in complete culture medium supplemented with 400 ng/ml of recombinant murine Flt-3L (generated in house from Chinese hamster ovary cell-derived, kindly provided by Kenneth Basel). On day 3, the medium was gently exchanged to fresh medium supplement with Flt-3L. On day 5, non-adherent cells were removed without dislodging clusters of developing DCs, and fresh medium was added supplement with Flt-3L.

On day 7, *in vitro* activation was accomplished by adding 1 μ g/ml of LPS *Escherichia Coli* (O55:B55; Sigma-Aldrich) to the FLDC cultures for 24h. The cells were washed twice with PBS and were recovered by adding 500 μ l of Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) 5 min at 37°C. Then, FLDCs were extensively washed, at least 3 times, with medium and were used as the tolerant FLDC group. As a naive control, FLDCs were cultured on day 7 with medium for 24h. The purity of cells was >90% of CD11c⁺ and were used as FLDCs. The Institutional Animal Care Committee reviewed and

approved all procedures performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines.

Flow cytometry

FLDCs were stained with varying combinations of mAbs following our previously described procedure with minor modifications²¹. The mAbs used to identify FLDC subsets generated were anti-mouse CD11c (BD Biosciences Pharmingen, Mississauga, ONT, Canada), anti-mouse CD24 (Mytlinei Biotec, Auburn, CA, USA) and anti-mouse CD11b Abs (Mytlinei Biotec). For the experiments investigating TLR4 modulation and maturation of FLDCs, we cultured both naive and tolerant FLDCs with 1µg/ml of LPS in complete RPMI 1640 media at 37°C for the indicated time. Following incubation, cells were washed three times with cold HBSS (Sigma-Aldrich), 0.1% BSA, 0.01% sodium azide (Sigma-Aldrich). TLR4/MD-2 expression on FLDCs was evaluated by flow cytometry using anti-TLR4/MD-2 (eBioscience, San Diego, CA, USA) and streptavidine-PECy5 (Cedarlane Laboratories, Hornby, ONT, Canada). Costimulatory molecules on FLDC subsets were also studied using anti-CD86 (B7.2)/CD80 (B7.1) (eBiosciences) and anti-MCH II (I-A/I-E) Abs (eBioscience). Following labelling procedures, cells were washed three times with cold HBSS, 0.1% BSA, 0.01% sodium azide and analyzed on FACScan® (Becton Dickinson, Mississauga, ONT, Canada) while WinMdi software was used for the analysis.

Immunoblotting

Naive and tolerant FLDCs were incubated in FBS-free medium for 1h as a resting time and stimulated with LPS (1µg/ml) for the indicated time period. Reactions were

halted by rapidly cooling on ice and these FLDCs were washed once with ice-cold PBS. FLDCs (1×10^6) were lysed in sample buffer (SDS reducing buffer) and boiled at 95°C for 5min. Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in running buffer (15g/L TrisBase, 72g/L glycine and 5g/L SDS) and transferred onto PVDF or nitrocellulose membrane (100 V, RT, 45 min). Membranes were blocked and stained with specific Abs for the phosphorylated form of p38 MAPK (BioSource, Camarillo, CA, USA), phospho-p46/p54 SAPK/JNK MAPK (Cell Signaling Pickering, ONT, Canada) and phospho-p44/42 ERK1/2 MAPK (Cell Signaling). Ab anti-MKP-1 (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was also used. Blots were visualized using secondary HRP-conjugated anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology) and chemiluminescence ECL plus (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada) detection reagents according to the manufacturer's protocol. Membranes that were probed with phospho-specific antibodies were stripped, blocked and probed with non-phosphorylated anti-p38 (Santa-Cruz Biotechnology), anti-SAPK/JNK (Cell Signaling) and anti-ERK1/2 Abs (Biosource). Signals on X-Ray films were scanned using a Bio-Rad.

EMSA

Naive or tolerant FLDCs (5×10^6 cells/ml) were stimulated with LPS (1 μ g/ml) for the indicated time period and were washed twice in cold PBS. Nuclear proteins from both groups were extracted using NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction kit (Pierce, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's instructions. Equal amount of nuclear proteins (7.5 μ g) was subjected to the test of NF- κ B binding using EMSA using LightShift Chemiluminescent EMSA kit (Pierce) with biotin double-branded oligonucleotide probe containing a consensus sequence for NF- κ B. NF- κ B sens

oligonucleotide was 5'-TTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'; and antisense oligonucleotide, 5'-GCCTGGGAAAGTCCCCTCAA-3'. Nuclear extracts were incubated with biotin end-labeled NF- κ B oligonucleotides (20fM/ μ l) for 20 min at room temperature. DNA/NF- κ B reactions were resolved on a 5% of native polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a Hybond-N⁺ membrane. The biotinylated complex was revealed using streptavidine-Horseradish Peroxidase conjugate and a chemiluminescent substrate. For the competition assay, proteins were pre-incubated with double-stranded unlabeled NF- κ B binding oligonucleotide at a 200-fold molar excess (4pM/ μ l). For the supershift assay 0.5 μ g of antibody for p65 (Santa Cruz Biotechnology) was added to the samples and incubated overnight at 4°C before adding reagents of EMSA kit.

Measurement of IL-10 and IL-12

Naive and tolerant FLDCs (2×10^5 cells/ml) were stimulated with LPS (1 μ g/ml) in complete RPMI1640 for 24h, and the culture supernatants were subjected to quantification of the cytokine level of IL-10 and IL-12p40 by ELISA using Mouse IL-12/IL-23 (Total p40) (eBioscience) and Mouse IL-10 ELISA ready Set-Go (eBioscience).

Statistical analysis

All data are expressed as mean +/- standard error of the mean (SEM). Data were analyzed by ANOVA test and Bonferroni multiple comparison post test using on *Graph Pad InStat* software program. Differences between groups were considered statistically significant when the probability that they occurred by chance was less than 5%.

Results

Phenotypic characterization of Flt-3L derived dendritic cells

We assessed the phenotype of our FLDCs using specific markers. Our culture of FLDCs obtained at day 7 after Flt-3L stimulation expressed 90% CD11c and did not express any B cell, NK cell nor T cell markers (Fig. 1A). As expected, approximately 10% of FLDCs are F4/80-positive as Brasel *et al.* had noted in their own FLDC culture²⁰. Two different populations constitute our CD11c⁺-FLDCs: 12% express CD45RA^{high}CD11c⁺ corresponding to pDCs and 59% express CD45RA^{low}CD11c⁺ as the cDCs (Fig. 1B). We next determined whether our CD45RA^{low}CD11c⁺ FLDC subpopulation contained the two distinct subsets observed in the murine spleen *in vivo*. CD24 is a surface molecule selectively expressed by CD8 α ⁺ cDCs, and CD11b is highly expressed on CD8 α ⁻ cDCs^{18;22}. As shown in Fig. 1B, we found that CD45RA^{low}CD11c^{high} cFLDCs contained two distinct subpopulations identified as CD24^{high}CD11b^{low} FLDC subset and CD24^{low}CD11b^{high}, referred as CD8⁺ DCs and CD8⁻ DCs respectively. As Shortman *et al.* have noted in their FLDCs¹⁸, we also observed higher percentage of CD24^{high} FLDCs (50%) as compared to CD11b^{high} FLDCs (21%).

Inhibition of TLR4/MD-2 up-regulated expression in FLDCs upon secondary TLR priming

As shown in Fig. 2, CD11c⁺-FLDCs express substantial levels of TLR4/MD-2. After 6 hours of LPS priming, the percentage of cells expressing TLR4/MD-2 was increased significantly on naive CD11c⁺-FLDCs (Fig. 2, $p < 0.001$). It has been reported that tolerance induction is associated with decreased cell surface TLR4/MD-2 expression and impairment of intracellular pathway. We observed a significant decrease of 38%

in the % of cells expressing TLR4/MD-2 in tolerant FLDCs group as compared to naive FLDCs following 6 hours of LPS priming (naive FLDCs: 14.7 ± 0.78 % and tolerant FLDCs 9.15 ± 0.21 %; **Fig.2**, $p < 0.001$). LPS tolerance of FLDCs was therefore associated with decreased TLR4/MD-2 expression.

Altered p38, SAPK/JNK MAPK activation and NF- κ B recruitment in tolerant FLDCs after LPS priming

It has been reported that p38 MAPK, JNK MAPK and ERK MAPK play different roles in inflammatory activation and tolerance induction of macrophages and DCs^{9,23-25}. Therefore, we examined whether p38 MAPK, JNK MAPK and ERK1/2 MAPK phosphorylation were differentially regulated in LPS tolerance induction. Firstly, we examined if our FLDCs show the same intracellular proteins that are involved in the activation of *in vivo* DCs. As shown in **Fig. 3A** an increase of the phosphorylated state of p38 MAPK, SAPK/JNK MAPK and ERK1/2 MAPK was observed after 30 min of LPS (1 μ g/ml) stimulation in naive FLDCs. In contrast, a decreased phosphorylation of both p38 MAPK and SAPK/JNK MAPK was noted from unstimulated state to 60 minutes after LPS-stimulation in tolerant FLDCs (**Fig. 3A**). Meanwhile, as compared with naive FLDCs, LPS-activated tolerant FLDCs showed enhanced phosphorylation of ERK1/2 MPAK (**Fig. 3A**). Only total of protein level of p38 was comparable between tolerant and naive groups. However, SAPK/JNK and ERK1/2 total protein level were slightly increased in the tolerant group as compared to naive.

We next observed NF- κ B activity in LPS-primed FLDCs which plays important role in pro-inflammatory response. To identify the transcription factor NF- κ B complex,

we performed EMSA with nuclear extracts from FLDCs using biotin-labelled oligonucleotides. Increased translocation of NF- κ B complex to the nucleus was detected in naive FLDCs following LPS (1 μ g/ml) treatment (**Fig. 3B**). NF- κ B activity reached a peak of intensity after 30 minutes of stimulation. However, we did not observe an increase of the NF- κ B complex recruitment to the nucleus in the LPS-primed tolerant FLDCs as compared to naive FLDCs (**Fig. 3B**). The upper complex appeared to be the specific one, as a molar excess of unlabeled oligonucleotide (**Fig. 3C**) inhibited its formation. Supershift assays using specific antibody for the p65/RelA subunit, demonstrated that increase of NF- κ B complex at 30 min of LPS stimulation was related to an increase of p65 subunit in naive FLDCs but not in tolerant FLDCs (**Fig. 3D**). Our results have showed that LPS tolerance induction of FLDCs induced a decrease of both p38 and SAPK/JNK MAPK phosphorylation level and p65/RelA translocation, two major intracellular pathways implicated in the inflammatory response activation.

TLR4 priming induced no modification of the maturation process in tolerant FLDCs

We next analyzed cell surface expression of maturation markers and cytokines production of FLDCs primed with LPS for 24 hours. As shown in **Fig. 4A**, the % of FLDCs expressing MHC class II, CD86, and CD80 expression were significantly up-regulated following a first stimulation with LPS (1 μ g/ml). The percentage of MHC II, CD86 and CD80 were respectively 24.31% \pm 6.38% vs 53.13% \pm 13.97% ($p < 0.05$), 28.52% \pm 7.69% vs 75.00% \pm 12.90% ($p < 0.001$) and 10.59% \pm 3.14% vs 60.76% \pm 12.38% ($p < 0.001$) between the unstimulated and LPS-stimulated FLDCs respectively. As noted in **Fig. 4B**, a second LPS stimulation of tolerant FLDCs did

not decreased the percentage of cells expressing maturation markers. No statistically significant difference of MHC II, CD86 and CD80 expression was observed between naive FLDCs and tolerant FLDCs ($75.82\% \pm 2.59\%$ vs $70.60\% \pm 4.80\%$ (CMHII), $75.34\% \pm 3.82\%$ vs $79.97\% \pm 1.77\%$ (CD86) and $73.47\% \pm 6.10\%$ vs $66.30\% \pm 0.10\%$ (CD80)).

Diminished IL-12p40 production and increased IL-10 in LPS-primed tolerant FLDCs

Many studies have focused on DC IL-12 and IL-10 cytokine production and their contribution in cell-mediated immunity or tolerance induction. As shown in **Fig. 5A**, spontaneous IL-12p40 secretion in unstimulated FLDCs was 133.09 ± 41.49 pg/ml. The secretion was significantly increased in LPS-primed FLDCs by 58% (7791.51 ± 211.73 pg/ml, $p < 0.001$). Although FLDCs respond to LPS by producing IL-12p40, we show that they produce also IL-10, an anti-inflammatory cytokine. Indeed FLDCs stimulated with LPS ($1\mu\text{g/ml}$) for up to 24 hours, secreted significant levels of IL-10 as compared to unstimulated FLDCs (74.02 ± 12.30 pg/ml to 11.29 ± 9.83 pg/ml respectively, $p < 0.001$ (**Fig. 5B**)). Our data demonstrate that the FLDCs obtained *in vitro* are very similar to cDCs present in spleen in their phenotypical characteristics as well as their activation profile following LPS stimulation.

Next, we examined these parameters when LPS tolerance was conducted in FLDCs. As noted in **Fig. 6A**, unstimulated tolerant FLDCs produced significantly higher quantity of IL-12p40 as compared to naive group; 4735.12 ± 539.22 pg/ml and 833.62 ± 155.43 pg/ml respectively ($p < 0.001$). After LPS treatment, we detected an IL-12p40 concentration around 5786.08 ± 542.85 pg/ml for tolerant group, which

represented an increase of 1.2% compared to a 58% increasing for naive group (Fig. 6A). Thus, the LPS tolerance induction exerted a significant inhibition of IL-12p40 synthesis ($p < 0.001$) in tolerant FLDCs as demonstrated by the lighter rise in IL-12 production. Moreover, second LPS challenge of primed cells resulted in an enhancement of IL-10 synthesis by five fold. LPS priming caused a significant increase of IL-10 production of tolerant FLDCs compared to naive FLDCs: 10.27 ± 7.78 pg/ml to 336.30 ± 116.67 pg/ml versus 11.29 ± 9.83 to 74.02 ± 12.30 respectively (Fig. 6B, $p < 0.001$). These findings suggest that tolerance in LPS-primed FLDCs inhibits IL-12 production as well as stimulates IL-10 production.

Increased MKP-1 phosphatase expression in LPS-stimulated tolerant FLDCs

MAPK phosphatases (MKPs) are dual-specificity phosphatases that inactivate MAPK members by dephosphorylating phosphotyrosine and phosphothreonine residues. One of these MKPs known to decrease p38 and JNK/SAPK MAPK activation and NO production in tolerant monocytes/macrophages is called the MKP-1²⁶⁻²⁸. However, no study has observed this phosphatase expression in DCs, which could also be essential in LPS tolerance induction. Therefore, we compared the MKP-1 level in both naive and tolerant FLDCs at their unstimulated state and following LPS treatment. As we noted an increase of p38 MAPK expression in LPS-naive FLDCs, we observed that MKP-1 was decreasing in a proportional manner in time (Fig. 7). In contrast, tolerant FLDCs exhibited a lower level of MKP-1 expression in the unstimulated state, which increased markedly following LPS priming (Fig. 7). Following 15 to 60 minutes of LPS stimulation we observed MKP-1 protein level enhancement in tolerant FLDCs associated with inhibition of p38 MAPK phosphorylation. Our results have demonstrated that LPS-tolerant FLDCs were associated with an increase of MKP-1

expression that could explain the decrease p38 and SAPK/JNK MAPK phosphorylation levels.

Discussion

The knowledge of DC functions and biology in immunity or in pathology is primordial for further therapeutic issues. Therefore, we investigated the potential of *in vitro*-derived DCs, the FLDCs, following inflammatory response and tolerance induction. In this study, we have shown that LPS pre-exposure reduced FLDC sensitivity to respond adequately to a second LPS challenge via their TLR4. LPS tolerance induced an inhibition of the TLR4/MD2 expression that resulted in altered TLR4 intracellular pathways and diminished IL-12p40 production. However, LPS tolerance in FLDCs induced an increase of the level of phospho-ERK1/2, which could be responsible for the enhanced IL-10 production. The altered MAPK signaling in LPS-stimulated tolerant FLDCs might also result from the increased MKP-1 activity as we have noted an important up-regulation of its expression. It seems that the DCs derived *in vitro* with Flt-3L are a good model for studying DC-biology because of their similarities to the murine splenic cDCs *in vivo*.

Naik *et al.* has noted that FLDCs are divided into two distinct subtypes: plasmacytoid CD45RA^{high} pDCs and conventional CD45^{low} cDCs¹⁸. These cDCs CD45^{low} could be then divided into two sub-populations termed as CD24^{high}CD11b^{low} DCs (CD8α⁺ cDCs equivalent) and CD24^{low}CD11b^{high} DCs (CD8α⁻ cDCs equivalent)¹⁸. These FLDCs sub-populations shared common characteristics with splenic DCs making them a good model for studying steady-state DC subsets ontogeny and functions. Our FLDCs are composed of three subtypes of DCs, known as the plasmacytoid pre-DCs (B200⁺) and the CD8α⁺-equivalent and CD8α⁻-equivalent cDC subsets that share properties with splenic cDCs. Until today, GM-DCs have been widely used as models for investigating DC-biology. However, it was recently that Xu and *al.* have

described those GM-DCs as an “inflammatory” DCs *in vivo*, rather than a steady-state cDCs¹⁶. It was demonstrated that GM-DCs express the surface marker CD11c⁺CD11b^{high}Mac-3⁺, and secrete NO and TNF- α . This cultured-DC population appears *in vivo* following infection or inflammation. It was reported that these inflammatory DCs could emerge after either GM-CSF-dependant inflammation¹⁷ or after infection with *Listeria monocytogenes*²⁹. Daro *et al.* have noted following LPS treatment an increased mortality from in mice that have received FL+pGM-CSF or pGM-CSF alone while no mice died in the group that has received FL alone³⁰. As pGM-CSF and FL + pGM-CSF induced large expansion in the number of cell *in vivo*, the increased mortality might be related to the increased number of inflammatory-like DCs. Thus, Flt-3L-derived DCs represents a good model for studying *in vivo* DC mechanisms as we have shown related properties of our FLDCs to the lymphoid-resident cDCs on a steady-state (without stimulation).

The splenic cDC subsets have unique TLR expression patterns, which enable them to respond directly to specific pathogens³¹. Naik and *al.* have demonstrated, in the unstimulated state, that mRNA level of TLR4 expression was equivalent between CD11b^{high} and CD24^{low} FLDCs subsets¹⁸. However, our study has provided new data about TLR4 modulation following LPS stimulation of FLDCs. We demonstrated that LPS treatment increased significantly the percentage of CD11c⁺FLDCs expressing TLR4/MD-2 receptor. This response closely resembles the murine splenic cDCs response to LPS (Patenaude and *al.*, unpublished observation). In our previous study, we have demonstrated that LPS stimulation induced up-regulation of the percentage of cells expressing TLR4 on both splenic CD8 α ⁻ and CD8 α ⁺ cDCs (Patenaude and *al.*, unpublished observation). Although Yanagawa and Onoe demonstrated a

considerable down-regulation of TLR4/MD-2 expression on GM-DCs by LPS treatment³², our results showed an adverse effect of LPS on TLR4/MD-2 of FLDCs. As GM-DCs are derived from CD11b^{high}Ly6C^{high} monocytes *in vivo*^{33,34} and are described as an “inflammatory DCs”¹⁶, they probably act like macrophages following LPS challenge; TLR4/MD-2 down-regulated expression on macrophages was reported following LPS treatment¹⁰.

As reported in GM-DCs^{32,35}, in splenic DCs (Patenaude and *al.*, unpublished observation) and in macrophages³⁶, we also noted that LPS stimulation increased both MAPK and NF- κ B activation in our FLDCs. MAPK activation and classical NF- κ B heterodimer nucleus translocation are implicated in co-stimulatory protein expression and pro-inflammatory cytokine synthesis of DCs^{24,37}. A recent study using specific inhibitors for all three MAPK have showed that maturation markers were affected following this treatment²⁴. Following inhibition of JNK MAPK activation diminished CD40, CD80 and CD86 expression of LPS-stimulated GM-derived DCs were observed. Beside maturation markers, cytokine profile synthesis is also dependant of the MAPK activation. Using specific MAPK inhibitors, they have observed changes of cytokine profile following TLR priming^{23,24}. Specific inhibitors for p38 and JNK MAPK caused a shut down of IL-12p40 while ERK1/2 MAPK inhibitor induced IL-10 decreasing in DCs. In our study, we observed in unstimulated FLDCs a basal phospho-level of all three MAPK that was up-regulated following LPS challenge. It has been reported that Flt-3L activated ERK1/2 MAPK in both a murine hematopoietic cell line, BaF3³⁸, and in human myeloid leukemia cell line, OCI-AML5³⁹. Flt-3L regulates expression of genes involved in cell cycle proliferation, such as transcription factors c-fos and c-myc, known to be transcriptionally regulated

by the ERK pathway. Thus, Flt-3L treatment might be responsible for the enhanced phospho-level of both p38, JNK and ERK1/2 MAPK which are related to FLDC proliferation. However, the increased phospho-level of all three MAPK in our FLDCs reflected the observed MAPK activation of splenic DCs following LPS treatment (Patenaude and *al.*, unpublished observation).

NF- κ B complex is also essential for establishing the inflammatory response of DCs. We noted that LPS induced a rapid increase of NF- κ B complex, more specifically the p65/RelA subunit, in nucleus of FLDCs. Recently the roles of NF- κ B p50, cRel and RelA subunits in regulating key TLR-induced genes were determined in GM-DCs³⁷. They noted that p50 and cRel specifically regulated mRNA expression of co-stimulatory molecules and secreted cytokines (IL-12 and IL-18) involved in T cell response following LPS treatment. On the other hand, RelA subunit of NF- κ B interacted with the co-activator CBP, which was crucial for expression of inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-1 α , in LPS-stimulated DCs. Further studies using FLDCs will be needed to elucidate the specific role of each MAPK family and NF- κ B subunits in inflammatory gene expression. However, our results demonstrated that LPS-stimulated FLDCs presented similar TLR4 intracellular pathway than the observed splenic DCs.

A recent study comparing GM-CSF/IL-4-derived and FL-derived rat DCs reported that resting GM-DCs expressed high levels expression of maturation markers (CMHII, CD86, CD80)⁴⁰. Xu and *al.* has also noted that GM-DCs showed a slightly more mature population than FLDCs in terms of CD86 expression¹⁶. Despite the expression

of CD80 and CD86, GM-DCs did not up-regulate the expression of maturation markers following TLR4-priming and could not stimulate allogeneic T cells in primary or secondary MLR. By contrast, their FLDCs showed an increase of CD80, CD86 and MHC class II in response to LPS or CpG and were able to activate both effector Th1 and potential regulatory IL-10-secreting T cells⁴⁰. As expected, LPS stimulation did increase the % of cells expressing CD80, CD86 and MHC class II in our FLDC culture. Enhancement of IL-12 production is also essential successful T cell stimulation, which makes FLDCs good cells for primary immune response. A marked difference between FLDCs and GM-DCs was observed in their capacity to produce IL-10 following first LPS stimulation. GM-DCs synthesize higher level of IL-10 following LPS treatments as compared to Flt-3L-derived DCs^{19;24;32;40}. Even if we have observed a significant IL-10 increase in LPS-stimulated FLDCs, the concentrations did not reach out the same levels than those obtained from GM-DCs. FLDCs obtained in Xu's study also produced IL-10 but at significant lower level than the IL-10 concentrations of LPS-stimulated GM-DCs¹⁶. Moreover, IL-10 levels observed in our FLDCs were equivalent to those observed in splenic DCs following LPS treatment (Patenaude and *al.*, unpublished observation)^{41,42}.

Although LPS-induced pro-inflammatory response, it is also established that a second challenge with bacterial LPS could trigger endotoxin tolerance. Most of LPS tolerance studies have been performed on macrophages and only a few studies address DC endotoxin tolerance. Moreover, LPS tolerance on DCs has been performed on GM-DCs. Since GM-DCs are not representative of resident DCs in secondary lymphoid organ, our study extent this endotoxin resistance to FLDCs for further application of *in vivo* pathologies like burn injury. A potential mechanism for

tolerance to LPS is the down-regulation of the receptor molecules. Inhibition of cell surface expression and mRNA of TLR4 has been suggested to underlie LPS tolerance in macrophages and liver DCs^{9;10;25;43}. Our results demonstrate an inhibition of TLR4/MD-2 increase on FLDCs, suggesting that tolerance induction on FLDCs reflects tolerance mechanisms of DCs *in vivo*. In a previous study, we have also observed a significant inhibition of TLR4/MD-2 up-regulation on DCs isolated from burned mice associated with an endotoxin-like tolerance syndrome (Patenaude and *al.*, observation unpublished). This inhibition of TLR4 up-regulation was noted only on CD8 α ⁺DCs subsets while burn injury did not affect TLR4/MD-2 expression on CD8 α ⁻DCs. Further studies will address this question of FLDC subtypes following LPS tolerance.

LPS tolerance is also associated with altered proximal post-protein intracellular signalling pathway following TLR-priming. Down-regulation of MAPK phosphorylation is a significant marker of LPS tolerance. In mice macrophages⁹ and in GM-DCs³², the pre-treatment with LPS altered mostly JNK and p38 phosphorylation upon a second LPS stimulation. MAPK phosphorylation shutdown is associated with imbalance between Th1 versus Th2 cytokine production. P38 MAPK suppression upon second exposure to LPS is associated with impaired IL-12p40 production³². In our study, we noted a suppression of both p38 and JNK MAPK phosphorylation following LPS tolerance, which could correlate with the observed inhibition of IL-12p40 synthesis. Even though we observed an inhibition of p38 MAPK activation in tolerant FLDCs when compared to naive FLDCs, we have noted a slightly increase of p38 activity 15 minutes following LPS treatment in tolerant group. Interestingly, it has been shown that p38 MAPK is crucial for the production

of IL-10 during LPS stimulation^{26,44,45}. As expected, IL-10 production and phospho-level of ERK1/2 of our tolerant FLDCs increased following LPS challenge. These results suggest that both p38 and ERK1/2 MAPK could regulate the IL-10 production in the tolerant group. IL-10 secretion after LPS stimulation down regulated the expression of the classic Th1 cytokine IL-12 in DCs⁴⁶. Therefore, increased IL-10 production in the tolerant group might act synergistically with JNK and p38 phospho-suppression for the impaired IL-12p40 synthesis. Decreased translocation of the p65/RelA NF- κ B subunit observed in LPS-stimulated tolerant FLDCs could also play a role in inhibition of IL-12p40 production.

A variety of anti-inflammatory proteins can be induced to modulate the strength and duration of the transduced signals following TLR priming. IL-1 receptor-associated kinase (IRAK)-M, suppressor cytokine signaling (SOCS) protein family, inhibitor- κ b and MKP-1 have been observed in endotoxin tolerance of macrophages⁹. MKP-1 phosphatase localizes in the nucleus and preferentially dephosphorylates activated p38 MAPK and JNK MAPK²⁷. A recent study that has demonstrated that inactivation of p38 and JNK was delayed in LPS-stimulated MKP-1-deficient macrophages without affecting ERK inactivation, supporting the notion that MKP-1 does not play a significant role in ERK MAPK²⁸. Cao and *al.* have noted in macrophage that acetylation of MKP-1 increased its interaction with p38, which caused its phosphatase activity increasing by >100% which resulted in decrease cellular phospho-p38 levels and an inhibition of the MAPK signaling cascade⁴⁷. According to these studies, we observed a marked increase of MKP-1 expression following LPS stimulation in tolerant FLDCs, which correlated with suppression of both p38 and JNK pathways and increased ERK1/2. In naive FLDCs we observed a high level of MKP-1

expression that was attenuated following LPS priming. As for MAPK phospho-level expression in unstimulated FLDCs, Flt-3L differentiation induced also MKP-1 expression. In human myeloid leukemia cell line, OCI-AML51, it was demonstrated that both G-CSF and FL induce transcription of MKP1 with peak induction at 1 h after cytokine treatment³⁹. It is possible that MKP1 plays a role in the desensitization of ERK and p38 MAP kinases in these unstimulated cells by turning on a 'negative feedback' loop to shut down further signaling. However, the decreased level of MKP-1 expression in naive FLDCs allows a robust inflammatory response for cytokine production following LPS challenge. In contrast, the rapid induction of MKP-1 in the tolerant group allows the system to shut down the inflammatory response and serves as a control mechanism to prevent an excessive reaction by the DCs. In addition, the enhanced MKP-1 expression in the tolerant group can be linked to increased IL-10 production. Hammer and *al.* have shown that IL-10 boosts MKP-1 expression in the LPS-stimulated macrophages, leading to an accelerated and long-lasting p38 deactivation⁴⁸. Further studies using specific inhibitors are needed to understand the impact of MKP-1 on specific MAPK phosphorylation and on the proinflammatory versus anti-inflammatory cytokine production.

In summary, this study provides evidence that FLDCs generated DCs closely resemble those *in vivo*, called the steady-state cDCs in response to inflammatory stimulus. We also demonstrated in this study that induction of LPS tolerance among the FLDCs produced a phenotype that was equivalent to the altered phenotype of splenic DCs observed after burn injury. Our present findings suggest that these *in vitro*-derived DCs are a better model for studying DC-biology than GM-DCs, based on their

phenotypical characteristics such as TLR4 expression, intracellular pathways, maturation and cytokine production.

Figures

Figure 1: Surface markers on FL cultures isolated on day 6 of the differentiation.

(A) FLDCs were stained with specific antibodies for expression of DC (CD11c⁺), macrophage (F4/80⁺), B cell (CD19⁺), NK cell (NK1.1⁺) and T cell (CD3⁺) markers to verify the purity of our FLDCs. The open curve (white), isotype control; the filled curve (grey), specific mAbs. (B) FLDC cultures were also stained with the indicated combinations of surface markers for DC subtypes. Cells were also gated on the CD11c⁺ population and their expression of CD24 and CD11b molecules determined using flow cytometry. The results were analyzed by flow cytometry using WinMdi software. All experiments were performed at least three times with similar results.

Figure 2: LPS priming of tolerant FLDCs inhibited up-regulation of TLR4/MD-2

expression on CD11c⁺FLDCS. The tolerant FLDCs were pre-treated with LPS (1µg/ml) for 18h. As a naive group, FLDCs were cultured with medium alone for the first 18h. Both group of FLDCs were washed and were stimulated with 1µg/ml of LPS for the indicated times and TLR4/MD-2 expression was measured by flow cytometry on total CD11c⁺-FLDCs using specific Abs. Results are presented as mean value ± SEM of four independent experiments (FLDCs of n= 4 mice/group were pooled). *** $p < 0.001$, using an ANOVA test with a Bonferroni post test to compare unstimulated FLDCs vs LPS-stimulated FLDCs and LPS-stimulated naive FLDCs vs tolerant FLDCs. The open curve (white), isotype control; the filled curve (grey), specific anti-TLR4/MD-2 mAb histogram.

Figure 3: Tolerance induction altered activation of p38, JNK and ERK1/2 MAPK and p65/RelA NF- κ B signaling in LPS-primed FLDCs. The tolerant FLDCs were pre-treated with LPS (1 μ g/ml) for 18h and naive FLDCs with medium alone. Both group of FLDCs were washed and were incubated with 1 μ g/ml of LPS for the indicated times. (A) The p38, SAPK/JNK and ERK1/2 MAPK phosphorylation were measured by Western blot as mentioned in *Material and Methods*. (B) NF- κ B DNA binding activity in both naive and tolerant FLDCs was analyzed by EMSA as described in *Material and Methods*. (C) For the competition assay, a 200-fold excess of unlabeled NF- κ B DNA probe was included in the binding reaction. n.s., non-specific. (D) Supershift analysis. Anti-p65 Ab was used to shift the binding complex observed in naive FLDCs stimulated with LPS (1 μ g/ml) for 30min. The results are from one representative experiment of three performed (FLDCs of n= 4 mice/group were pooled).

Figure 4: Tolerance induction was not associated with decreased maturation marker expression. (A) On day 6 of the differentiation, FLDCs were incubated with 1 μ g/ml of LPS for 18h. The cell surface expression of costimulatory molecules using specific Abs: PE-conjugated anti-CD11c, FITC-conjugated anti-CMHII, PE-conjugated CD86 or biotin-conjugated anti-CD80. Results are representing of three experiments (FLDCs of n= 4 mice/group were pooled). * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ using an ANOVA test with a Bonferroni post test to compare unstimulated vs LPS-stimulated FLDCs. The open curve (white), unstimulated FLDCs; filled curve (grey), LPS-stimulated FLDC histogram. (B) The tolerant FLDCs were pretreated with LPS (1 μ g/ml) for 18h and naive FLDCs with medium alone for the first 18h. Both naive

and tolerant FLDCs were incubated with LPS (1 μ g/ml) for an additional 18h and costimulatory molecules were analyzed. Results are representing of three experiments (FLDCs of n= 4 mice/group were pooled). The open curve (white), LPS-stimulated naive FLDCs; the filled curve (grey), LPS-stimulated tolerant FLDC histogram.

Figure 5: Enhanced IL-12p40 and IL-10 production by LPS-stimulated FLDCs.

FLDCs differentiated on day 6 were stimulated with 1 μ g/ml of LPS for 24h. The supernatants were harvested and IL-12p40 and IL-10 production by FLDCs were evaluated by ELISA. Results are presented as mean value \pm SEM of three independent experiments (FLDCs of n= 4 mice/group were pooled). *** $p < 0.001$, using an ANOVA test with a Bonferroni post test to compare unstimulated vs LPS-stimulated FLDCs.

Figure 6: Shift between IL-12p40 and IL-10 production of TLR4-primed naive versus tolerant FLDCs.

The tolerant FLDCs were pretreated with LPS (1 μ g/ml) for 18h. As a naive group, FLDCs were cultured with medium alone for the first 18h. FLDCs from both groups were stimulated with 1 μ g/ml of LPS for an additional 24h. The supernatants were harvested and IL-12p40 and IL-10 production by FLDCs were evaluated by ELISA. Results are presented as mean value \pm SEM of three independent experiments (FLDCs of n= 4 mice/group were pooled; *** $p < 0.01$, using an ANOVA test with a Bonferroni post test to compare naive vs tolerant LPS-stimulated FLDCs.

Figure 7: Enhanced MKP-1 expression in TLR4-primed tolerant FLDCs.

The tolerant FLDCs were pretreated with LPS (1 μ g/ml) for 18h and naive FLDCs with

medium alone. FLDCs were incubated with 1 μ g/ml of LPS for the indicated times and p38 MAPK phosphorylation and MKP-1 expression was measured by Western blot as mentioned in *Material and Methods*. Results are representative of one experiment of three independent experiments (FLDCs of n= 4 mice/group were pooled).

Reference List

1. Shortman, K. and Y. J. Liu. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2:151-61.
2. Beg, A. A. 2002. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol* 23:509-12.
3. Cools, N., P. Ponsaerts, V. F. Van Tendeloo, and Z. N. Berneman. 2007. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J Leukoc Biol* 82:1365-74.
4. Larsen, C. P., S. C. Ritchie, T. C. Pearson, P. S. Linsley, and R. P. Lowry. 1992. Functional expression of the costimulatory molecule, B7/BB1, on murine dendritic cell populations. *J Exp Med* 176:1215-20.
5. Inaba, K., M. Witmer-Pack, M. Inaba, K. S. Hathcock, H. Sakuta, M. Azuma, H. Yagita, K. Okumura, P. S. Linsley, S. Ikehara, S. Muramatsu, R. J. Hodes, and R. M. Steinman. 1994. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* 180:1849-60.
6. Kalinski, P., C. M. Hilkens, E. A. Wierenga, and M. L. Kapsenberg. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 20:561-7.
7. Pulendran, B., J. L. Smith, G. Caspary, K. Brasel, D. Pettit, E. Maraskovsky, and C. R. Maliszewski. 1999. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1036-41.
8. Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain, and M. Moser. 1999. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* 189:587-92.
9. Fan, H. and J. A. Cook. 2004. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res* 10:71-84.
10. Nomura, F., S. Akashi, Y. Sakao, S. Sato, T. Kawai, M. Matsumoto, K. Nakanishi, M. Kimoto, K. Miyake, K. Takeda, and S. Akira. 2000. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 164:3476-9.
11. Adib-Conquy, M. and J. M. Cavaillon. 2002. Gamma interferon and granulocyte/monocyte colony-stimulating factor prevent endotoxin tolerance in human monocytes by promoting interleukin-1 receptor-associated kinase expression and its association to MyD88 and not by modulating TLR4 expression. *J Biol Chem* 277:27927-34.
12. Medvedev, A. E., P. Henneke, A. Schromm, E. Lien, R. Ingalls, M. J. Fenton, D. T. Golenbock, and S. N. Vogel. 2001. Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster

- ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 or 4. *J Immunol* 167:2257-67.
13. Randow, F., U. Syrbe, C. Meisel, D. Krausch, H. Zuckermann, C. Platzer, and H. D. Volk. 1995. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J Exp Med* 181:1887-92.
 14. McBride, J. M., T. Jung, J. E. de Vries, and G. Aversa. 2002. IL-10 alters DC function via modulation of cell surface molecules resulting in impaired T-cell responses. *Cell Immunol* 215:162-72.
 15. Toliver-Kinsky, T. E., W. Cui, E. D. Murphey, C. Lin, and E. R. Sherwood. 2005. Enhancement of dendritic cell production by fms-like tyrosine kinase-3 ligand increases the resistance of mice to a burn wound infection. *J Immunol* 174:404-10.
 16. Xu, Y., Y. Zhan, A. M. Lew, S. H. Naik, and M. H. Kershaw. 2007. Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. *J Immunol* 179:7577-84.
 17. Naik, S. H., D. Metcalf, A. van Nieuwenhuijze, I. Wicks, L. Wu, M. O'Keeffe, and K. Shortman. 2006. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* 7:663-71.
 18. Naik, S. H., A. I. Proietto, N. S. Wilson, A. Dakic, P. Schnorrer, M. Fuchsberger, M. H. Lahoud, M. O'Keeffe, Q. X. Shao, W. F. Chen, J. A. Villadangos, K. Shortman, and L. Wu. 2005. Cutting edge: generation of splenic CD8⁺ and CD8⁻ dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J Immunol* 174:6592-7.
 19. Brawand, P., D. R. Fitzpatrick, B. W. Greenfield, K. Brasel, C. R. Maliszewski, and T. De Smedt. 2002. Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs. *J Immunol* 169:6711-9.
 20. Brasel, K., T. De Smedt, J. L. Smith, and C. R. Maliszewski. 2000. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* 96:3029-39.
 21. Patenaude, J., M. D'Elia, C. Hamelin, D. Garrel, and J. Bernier. 2005. Burn injury induces a change in T cell homeostasis affecting preferentially CD4⁺ T cells. *J Leukoc Biol* 77:141-50.
 22. Vremec, D., J. Pooley, H. Hochrein, L. Wu, and K. Shortman. 2000. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 164:2978-86.
 23. Nakahara, T., Y. Moroi, H. Uchi, and M. Furue. 2006. Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *J Dermatol Sci* 42:1-11.
 24. Dowling, D., C. M. Hamilton, and S. M. O'Neill. 2008. A comparative analysis

of cytokine responses, cell surface marker expression and MAPKs in DCs matured with LPS compared with a panel of TLR ligands. *Cytokine*.

25. Medvedev, A. E., K. M. Kopydlowski, and S. N. Vogel. 2000. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol* 164:5564-74.
26. Chi, H., S. P. Barry, R. J. Roth, J. J. Wu, E. A. Jones, A. M. Bennett, and R. A. Flavell. 2006. Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2274-9.
27. Franklin, C. C. and A. S. Kraft. 1997. Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells. *J Biol Chem* 272:16917-23.
28. Zhao, Q., X. Wang, L. D. Nelin, Y. Yao, R. Matta, M. E. Manson, R. S. Baliga, X. Meng, C. V. Smith, J. A. Bauer, C. H. Chang, and Y. Liu. 2006. MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock. *J Exp Med* 203:131-40.
29. Serbina, N. V., T. P. Salazar-Mather, C. A. Biron, W. A. Kuziel, and E. G. Pamer. 2003. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19:59-70.
30. Daro, E., E. Butz, J. Smith, M. Teepe, C. R. Maliszewski, and H. J. McKenna. 2002. Comparison of the functional properties of murine dendritic cells generated in vivo with Flt3 ligand, GM-CSF and Flt3 ligand plus GM-CSF. *Cytokine* 17:119-30.
31. Edwards, A. D., S. S. Diebold, E. M. Slack, H. Tomizawa, H. Hemmi, T. Kaisho, S. Akira, and e. Reis Sousa C. 2003. Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur J Immunol* 33:827-33.
32. Yanagawa, Y. and K. Onoe. 2007. Enhanced IL-10 production by TLR4- and TLR2-primed dendritic cells upon TLR restimulation. *J Immunol* 178:6173-80.
33. Naik, S. H., D. Metcalf, A. van Nieuwenhuijze, I. Wicks, L. Wu, M. O'Keeffe, and K. Shortman. 2006. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* 7:663-71.
34. Naik, S., D. Vremec, L. Wu, M. O'Keeffe, and K. Shortman. 2003. CD8alpha+ mouse spleen dendritic cells do not originate from the CD8alpha- dendritic cell subset. *Blood* 102:601-4.
35. An, H., Y. Yu, M. Zhang, H. Xu, R. Qi, X. Yan, S. Liu, W. Wang, Z. Guo, J. Guo, Z. Qin, and X. Cao. 2002. Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. *Immunology* 106:38-45.

36. Guha, M. and N. Mackman. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13:85-94.
37. Wang, J., X. Wang, S. Hussain, Y. Zheng, S. Sanjabi, F. Ouaz, and A. A. Beg. 2007. Distinct roles of different NF-kappa B subunits in regulating inflammatory and T cell stimulatory gene expression in dendritic cells. *J Immunol* 178:6777-88.
38. Zhang, S., C. Mantel, and H. E. Broxmeyer. 1999. Flt3 signaling involves tyrosyl-phosphorylation of SHP-2 and SHIP and their association with Grb2 and Shc in Baf3/Flt3 cells. *J Leukoc Biol* 65:372-80.
39. Srinivasa, S. P. and P. D. Doshi. 2002. Extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways cooperate in mediating cytokine-induced proliferation of a leukemic cell line. *Leukemia* 16:244-53.
40. Taieb, A., J. J. Breiting, J. V. Unadkat, W. J. Shufesky, A. E. Morelli, A. W. Thomson, W. P. Lee, and M. Feili-Hariri. 2007. Intrinsic ability of GM+IL-4 but not Flt3L-induced rat dendritic cells to promote allogeneic T cell hyporesponsiveness. *Clin Immunol* 123:176-89.
41. Fujimi, S., P. H. Lapchak, Y. Zang, M. P. MacConmara, A. A. Maung, A. J. Delisle, J. A. Mannick, and J. A. Lederer. 2009. Murine dendritic cell antigen-presenting cell function is not altered by burn injury. *J Leukoc Biol* 85:862-70.
42. Kawasaki, T., M. A. Choudhry, M. G. Schwacha, S. Fujimi, J. A. Lederer, K. I. Bland, and I. H. Chaudry. 2008. Trauma-hemorrhage inhibits splenic dendritic cell proinflammatory cytokine production via a mitogen-activated protein kinase process. *Am J Physiol Cell Physiol* 294:C754-64.
43. De Creus, A., M. Abe, A. H. Lau, H. Hackstein, G. Raimondi, and A. W. Thomson. 2005. Low TLR4 expression by liver dendritic cells correlates with reduced capacity to activate allogeneic T cells in response to endotoxin. *J Immunol* 174:2037-45.
44. Ma, W., W. Lim, K. Gee, S. Aucoin, D. Nandan, M. Kozlowski, F. Diaz-Mitoma, and A. Kumar. 2001. The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. *J Biol Chem* 276:13664-74.
45. Guo, X., R. E. Gerl, and J. W. Schrader. 2003. Defining the involvement of p38alpha MAPK in the production of anti- and proinflammatory cytokines using an SB 203580-resistant form of the kinase. *J Biol Chem* 278:22237-42.
46. Yao, Y., W. Li, M. H. Kaplan, and C. H. Chang. 2005. Interleukin (IL)-4 inhibits IL-10 to promote IL-12 production by dendritic cells. *J Exp Med* 201:1899-903.
47. Cao, W., C. Bao, E. Padalko, and C. J. Lowenstein. 2008. Acetylation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 inhibits Toll-like receptor signaling. *J Exp Med* 205:1491-503.

48. Hammer, M., J. Mages, H. Dietrich, F. Schmitz, F. Striebel, P. J. Murray, H. Wagner, and R. Lang. 2005. Control of dual-specificity phosphatase-1 expression in activated macrophages by IL-10. *Eur J Immunol* 35:2991-3001.

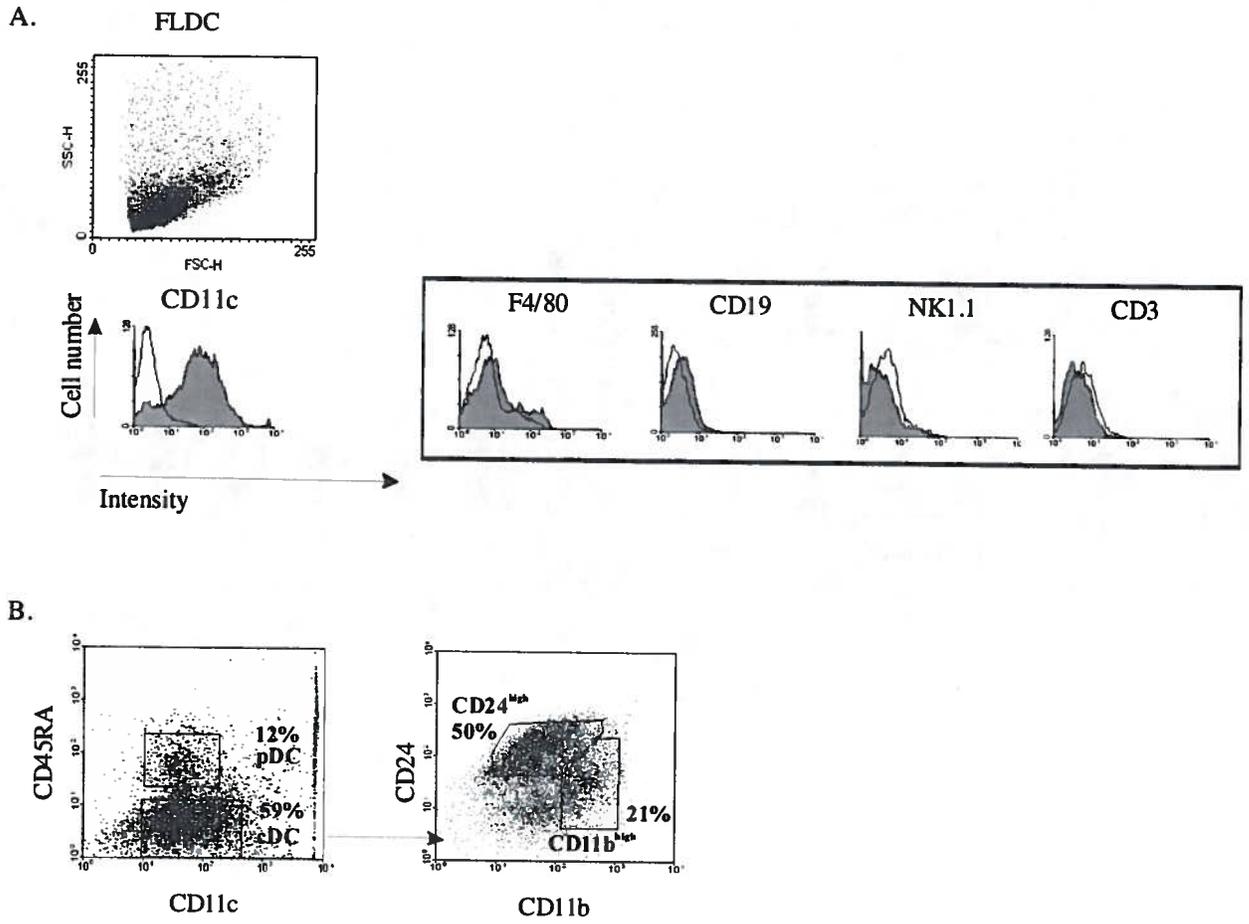


Figure 1

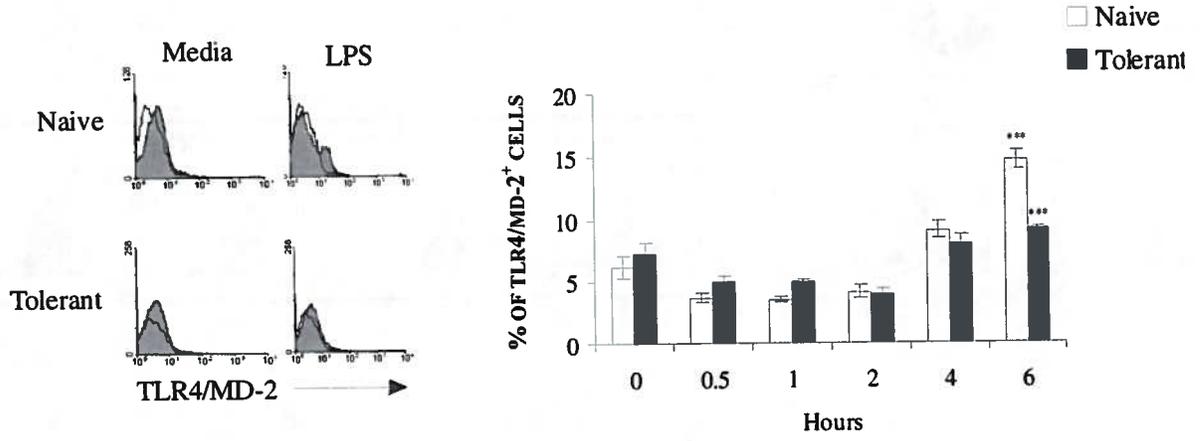
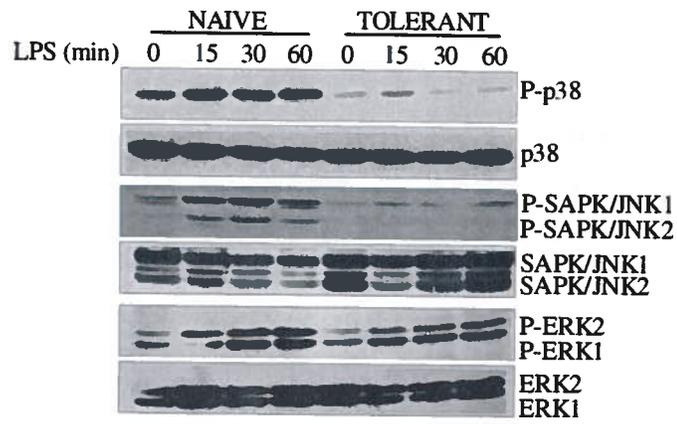
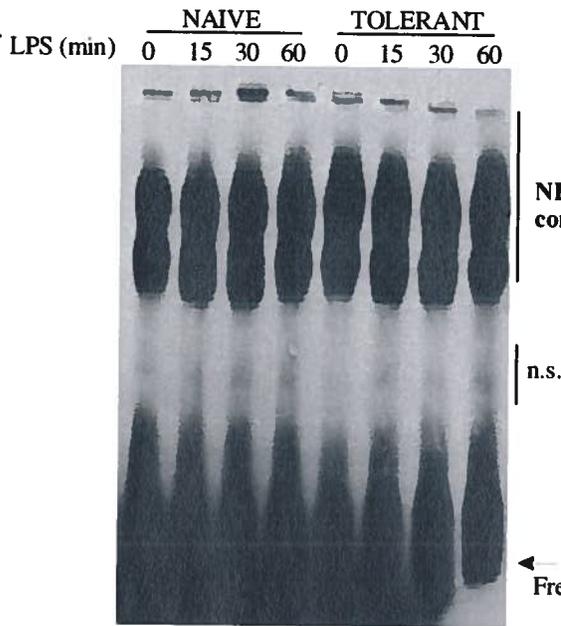


Figure 2

A.



B.



C.



D.

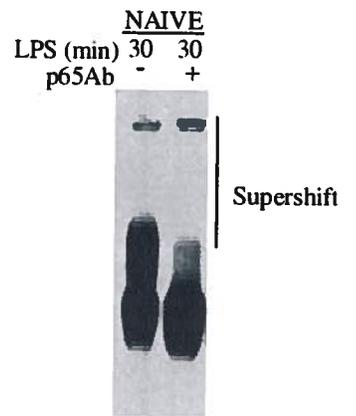


Figure 3

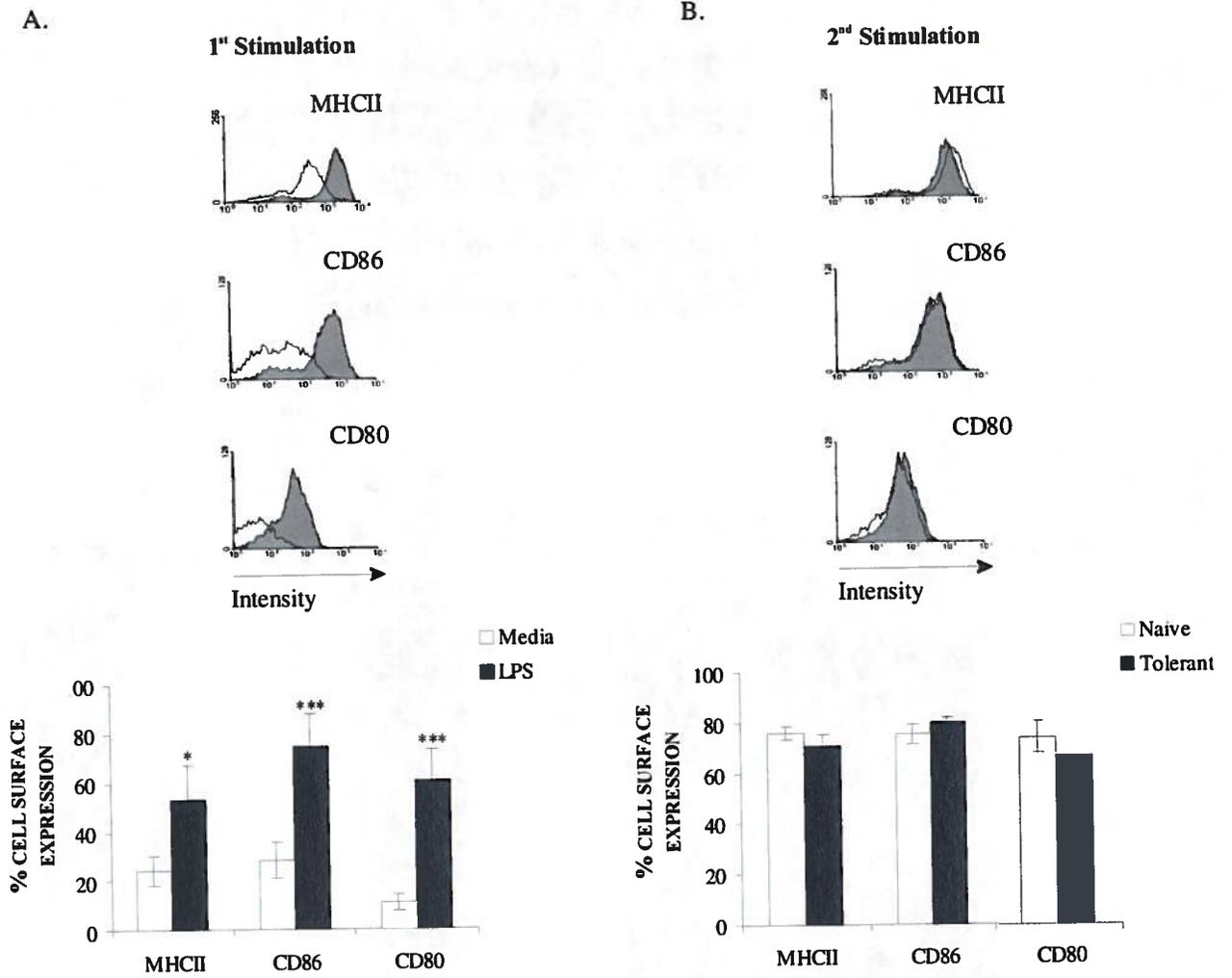
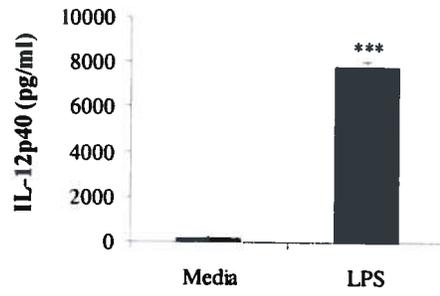


Figure 4

A.



B.

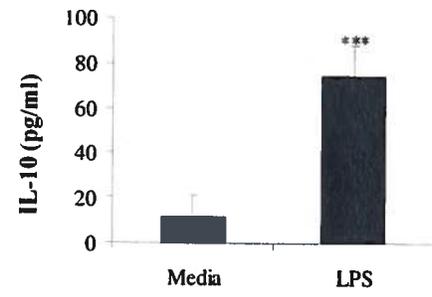
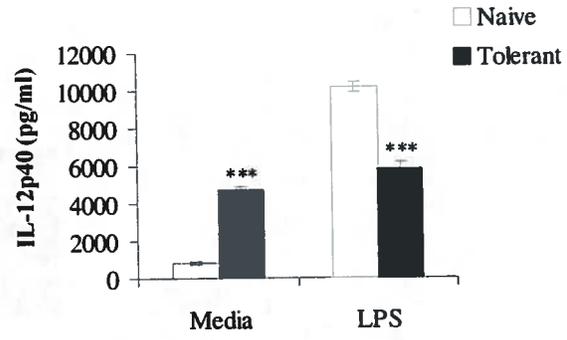


Figure 5

A.



B.

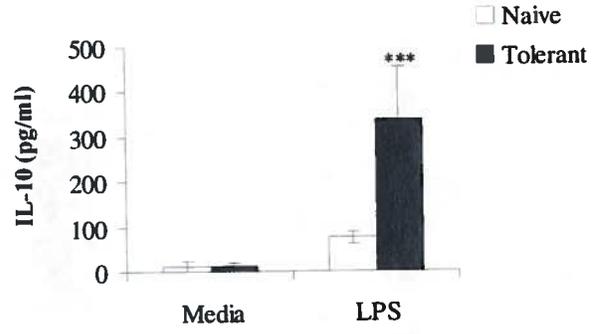
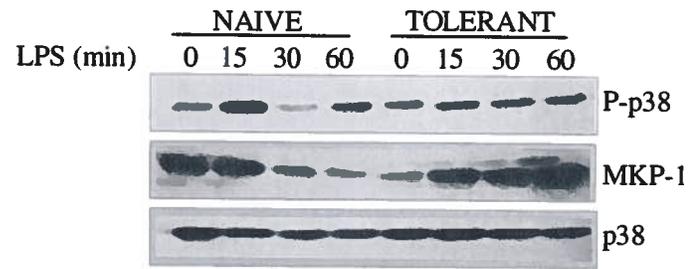


Figure 6

**Figure 7**

CHAPITRE 5 : ARTICLE III

Mise en contexte

Une trop forte activation du TLR4 durant la phase précoce d'une brûlure sévère peut engendrer des altérations fonctionnelles des cellules cibles vers un état de tolérance face aux endotoxines. Des modifications au niveau de la chromatine peuvent être responsables de la diminution des cytokines pro-inflammatoires lors de la tolérance aux endotoxines. Il a été observé chez les cellules THP-1 une diminution de l'acétylation des histones causant diminution de l'accessibilité et de la transcription des gènes pro-inflammatoires lors de l'induction de la tolérance aux LPS (El Gazzar et al., 2007a). L'acétylation s'effectue sur les résidus lysine par des enzymes nommées histones acétyl transférases (HATs). Elle diminue l'interaction entre les queues des histones et le fragment d'ADN, ce qui entraîne le relâchement de la chromatine et permet ainsi la transcription des gènes (Barnes, Adcock et Ito, 2005). L'acétylation est réversible grâce à l'action des histones désacétylases (HDACs) (Gregoretti, Lee et Goodson, 2004). Bien que les HDACs ait été identifiées comme des répresseurs de la transcription, des études ont démontré un effet de causalité entre l'activation des HDACs, dont HDAC1, 2, et 3 et l'induction de la réponse inflammatoire chez les MAC et les CD4 (Aung et al., 2006; Brogdon et al., 2007; Yu, Zhang et Kone, 2002). D'autres équipes de recherche ont également démontré un lien entre l'activité des HDACs et la régulation de la réponse inflammatoire via l'utilisation de modulateurs des HDAC. Il a été noté que certains iHDACs, dont la trichostatine A (TSA) (Yu, Zhang et Kone, 2002) et le sodium butyrate (NaBu) (Saemann et al., 2000), ont un potentiel anti-inflammatoire. La théophylline, qui est un aHDAC, semble également posséder une action régulatrice dans la réaction inflammatoire via une augmentation de l'activité des HDACs initiant la sensibilité des cellules aux glucocorticoïdes (Ito et al., 2002; Ito et al., 2006a). Ces modifications au niveau de l'acétylation des histones et du remodelage de la chromatine, communément nommées modifications épigénétiques, peuvent être à l'origine des perturbations observées chez les CD4. Les modulateurs d'HDACs représentent une nouvelle approche thérapeutique non invasive dans le traitement de pathologies associées à une mauvaise régulation de la réponse inflammatoire (Mishra et al., 2003). Il pourrait s'avérer être bénéfique d'utiliser ces nouveaux médicaments dans la régulation de l'immunité suivant le traumatisme de la brûlure sévère.

Plus spécifiquement, nous voulions :

1. Caractériser l'expression et l'activité des HDACs chez les FLDCs devenues tolérantes aux LPS ;
2. Évaluer le rôle des HDACs, à l'aide d'iHDACs et d'aHDACs, dans l'apparition de tolérance aux LPS chez les FLDCs.

Résumé français

Theophylline restores IL-12p40 production in LPS tolerance induction of Flt-3L-derived dendritic cells.

Patenaude Julie*, D'Elia Michele*, Bernier Jacques*

* INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec

L'activation des TLRs induit une cascade moléculaire nécessaire à l'induction de la réponse inflammatoire. Afin d'éviter que cette activation des TLRs perdure, elle se doit d'être finement régulée. La majorité des mécanismes de régulation des TLRs impliquent l'expression de molécules inhibitrices de la voie intracellulaire. Il en résulte d'une inhibition de la réponse inflammatoire et l'apparition du phénomène de tolérance aux endotoxines lors d'une seconde stimulation. De récentes études ont démontré que des modifications épigénétiques au niveau de la chromatine des gènes de la réponse inflammatoire pouvaient être à l'origine de l'état de tolérance aux endotoxines. Le but de cette étude a été d'élucider l'implication de l'activité des histones désacétylases (HDACs) dans l'induction de la tolérance aux LPS chez les CD. Plus spécifiquement, nous avons évalué l'activité des HDACs de classe I (HDAC-1, -2 et -3) sur la régulation de l'IL-12p40 lors de la seconde stimulation aux LPS des CD. Dans un premier temps, nous avons observé que l'induction de tolérance aux LPS des CD induit une hausse de l'activité des HDACs (HDAC-2 et HDAC-3) sans changement significatif de l'expression de ces enzymes. Ainsi, nous avons utilisé deux modulateurs de HDACs, soit un inhibiteur (trichostatine A) et un activateur (théophylline), afin de caractériser le rôle de ces enzymes dans la régulation de l'IL-12p40 des CD. Bien que nous ayons noté une hausse de l'activité des HDACs, une inhibition de celle-ci ne permet pas un rétablissement de la production d'IL-12p40. Au contraire, l'inhibition des HDACs induit une suppression d'IL-12p40 sécrétée autant chez les CD du groupe témoin que du groupe de tolérance aux LPS. Toutefois, nous avons démontré que la théophylline permet un renversement de l'induction de tolérance aux LPS des CD. Les CD tolérantes traitées à la théophylline produisent de l'IL-12p40 à des niveaux similaires à ceux observés chez les CD du groupe témoin lors de stimulation aux LPS. Cette récupération de la production d'IL-12p40 chez les CD tolérantes est liée à une augmentation de la

forme phosphorylée de la p38 MAPK. Nos résultats démontrent que l'induction de la tolérance aux LPS chez les CD4⁺ est associée à une perturbation de l'activité des HDACs diminuant la transcription du gène à l'IL-12p40.

Manuscrit soumis pour révision *Immunology*

Contribution des auteurs

Avec l'aide de Michele D'Elia, qui a travaillé à la mise au point des immunobuvardages de type western, j'ai réalisé toutes les expériences décrites dans cet article ainsi que l'analyse. J'ai écrit ce manuscrit en collaboration avec le Dr Bernier.

**THEOPHYLLINE RESTORES IL-12p40 PRODUCTION IN LPS
TOLERANCE INDUCTION OF FLT-3L-DERIVED DENDRITIC CELLS.**

Theophylline restores IL-12p40 production in LPS tolerance induction of Flt-3L-derived dendritic cells.

Patenaude Julie*, D'Elia Michele*, Bernier Jacques*

* INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec

Address for correspondence and reprint requests:

INRS-Institut Armand-Frappier

531 boul. des Prairies

Laval (Québec) H7V 1B7

jacques.bernier@iaf.inrs.ca

Tél.: (450)687-5010

Fax : (450)686-5566

Key Words: Dendritic cells, Endotoxin tolerance, HDACs, Trichostatin A,

Theophylline

ABSTRACT

Toll-like receptors (TLRs) induce a multi-component inflammatory response that must be tightly regulated to avoid tissue damage. Most known regulatory mechanisms target TLR intracellular signalling pathways and thus broadly inhibit multiple aspects of the inflammatory response which induces a phenomenon called endotoxin tolerance. Recently, chromatin modifications on pro-inflammatory gene have emerged as one of the possible mechanism of endotoxin tolerance induction. The aim of this study was to evaluate if endotoxin tolerance induction of DCs was associated with dysregulation of HDAC remodelling chromatin. We focused on the LPS-stimulated expression of the interleukine-12p40 and tested the hypothesis that alterations in HDAC activity are implicated in decrease IL-12 gene expression after second exposure to LPS, a phenomenon called endotoxin tolerance. We report here that endotoxin tolerance induced increase of class I HDAC activity (HDAC-2 and HDAC-3) in the tolerant DCs after LPS “second exposure”. Even though we observed an increase of specific HDAC, the use of HDAC inhibitor, trichostatin A (TSA), could not restore or block the reduced IL-12p40 production in LPS-stimulated tolerant DCs. However, we demonstrated that reactivating HDAC activity by an HDAC activator (theophylline) during LPS “second exposure” could restore IL-12p40 secretion. Theophylline treatment also increased p38 MAPK phosphorylation state in tolerant DCs, which could be responsible for the enhanced IL-12p40 production. These results illustrate that LPS tolerance induction is associated with HDAC perturbations and reveal a role of these enzymes in regulating gene expression in DCs.

INTRODUCTION

Toll-like receptor 4 (TLR4) has a critical role in the inflammatory response to infection and in the phenomenon of endotoxin tolerance: the transient unresponsiveness of cells or organisms to repeated or prolonged stimulation by bacterial lipopolysaccharides (LPS)^{1,2}. Endotoxin tolerance is mostly present in blood leukocytes obtained from human and animals that survived from a severe systemic inflammation³. The systemic inflammation response is tightly regulated by multiple regulatory mechanisms to control the extent and duration of the TLR4-induced inflammation. These include the inhibition of TLR4 signalling by inducible negative regulators, production of anti-inflammatory cytokine IL-10 and alterations of the TLR4 signalling⁴. However, it was recently noted that LPS tolerance of macrophages implicated silencing of inflammatory genes at the chromatin level^{5,6}. Several pro-inflammatory genes induced of first LPS stimulation are either not re-induced or induced to a much lesser extent by a second stimulation, when macrophages exhibit maximal tolerance. Taken together, these results mean that LPS tolerance is associated with modifications of TLR specific gene regulation.

The expression of many genes, including those encoding pro-inflammatory mediators involves the remodelling of the chromatin structure provided by histone proteins. Histone modifying enzymes, as histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs), are critical for controlling the dynamics of chromatin structure⁷. Histone acetylation by HATs remodels chromatin by acetylating the tails of histone which disrupts chromatin folding and maintains the unfolded structure of the transcribed nucleosome. H3 acetylation of Lys⁹ and Lys¹⁴ is well characterized histone modifications associated with transcriptional regulation and activation of some

known (IL-12, MCP-1, IL-6) and unidentified mediators^{8,9}. In contrast to HATs, recruitment of histone deacetylase (HDACs) leads to repression of transcription via chromatin condensation. So far, the family of HDAC enzymes consists of 17 isoforms grouped into three classes¹⁰. Whereas the class I HDACs (HDAC-1, -2, -3, -8, and -11) reside almost exclusively in the nucleus, the class II HDACs (HDAC-4, -5, -6, -7, -9, and -10) are able to shuttle between the nucleus and cytoplasm in response to certain cellular signals. The third HDAC class is NAD⁺ dependent, consisting of sirtuins 1–6. Various members of the class I HDAC family have been shown to play a role in the regulation of cell proliferation and inflammatory responses. It has been reported that a number of non-histone proteins, such as p53, IL-6, IL-12p40 promoters and STAT3, have been identified as substrates for class I HDAC activity¹¹⁻¹³. These studies indicated a novel mechanism of action of HDACs in modulating gene expression at a level of the chromatin in response to TLR-stimulation of dendritic cells and macrophages.

Small molecules capable of inhibiting both class I and II HDAC activities, such as suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), trichostatin A (TSA), and others, induce general histone acetylation and are promising anti-cancer agents^{14,15}. However, HDACs inhibitors also act as an inflammatory repressor, as observed in systemic lupus erythematosus¹⁶, septic shock¹⁷, asthma¹⁸ and experimental autoimmune encephalomyelitis¹⁹. Sodium butyrate, an HDAC inhibitor, has potent anti-inflammatory effects on *Staphylococcus aureus* cell-stimulated human monocytes resulting in suppression of both IL-12p35 and IL-12p40 mRNA IL-12 associated with a massive increase of IL-10 secretion²⁰. In this study, it was also noted that butyrate enhanced IL-10 and IL-4 secretion but reduced the release of IL-2 and interferon- γ in

anti-CD3-stimulation peripheral blood mononuclear cells. This effect was partly a result of suppressed IL-12 production and IL-12 receptor expression on T cells²⁰. This latter result seemed to indicate a role for HDACs in inflammatory response following pathogen stimulation.

Bode and *al.* have assessed the contribution of class I HDACs to TLR-regulated gene expression by using specific HDAC inhibitor, such as trichostatin A (TSA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)¹¹. They have demonstrated that HDACs are required for Rel-A and IRF-1 co-factors recruitment and their binding to DNA for efficient TLR-mediated Il-12p40 gene expression in DCs and macrophages. Theophylline, a class I HDAC activator, has the capacity to regulate inflammatory response by increasing HDAC activity²¹. Low concentrations of theophylline had a stimulatory effect on HDAC activity in BAL macrophages and in a human epithelial cell line (A549) despite LPS-induced repression of HDAC activity. It was demonstrated that low concentrations of theophylline were able to inhibit the activation of NF- κ B and reduce the expression of inflammatory genes in a manner similar to corticosteroids²². In these models, HDACs seem to play a role in the production of immunostimulatory and/or proinflammatory cytokines following pathogen stimulation.

IL-12 is mostly secreted by dendritic cells and plays a pivotal role in activating T cell responses. After severe injuries or in endotoxin tolerance induction, TLR4-intracellular pathway activation and levels of IL-12 are significantly repressed following a second LPS stimulation of DCs (Patenaude J et al., In manuscript)²³⁻²⁶. Endotoxin tolerance suppresses IL-12 secretion of dendritic cells via nuclear

transcriptional and post-transcriptional mechanisms. It was suggested that repressed gene expression in endotoxin tolerance involve a decrease in transcription which altered inflammatory cytokine secretion²⁷. Some studies have demonstrated decrease NF- κ B translocation and DNA-binding in tolerant cells, while others have shown normal transcription factor activation with decrease proinflammatory gene expression²⁸. It was demonstrated that TNF- α gene expression was attenuated by chromatin modifications in endotoxin tolerance induction of THP-1 without suppression of p65 level in nucleus⁶. This paradox might lead us to hypothesize that endotoxin tolerance may be associated with imbalance in HDAC activity which contribute to chromatin modifications on IL-12p40 gene expression of tolerant DCs.

Therefore, we investigated the role of HDACs in endotoxin tolerance in the suppression of DC IL-12 production. Class I member HDACs expression and activity was assessed in LPS-stimulated tolerant DCs. We also used the specific HDAC inhibitor TSA and the HDAC activator theophylline to clarify the role of HDACs in regulating IL-12 production following a second exposure of DCs to endotoxin.

MATERIAL AND METHODS

Generation of DCs

FLDCs were generated from male C57Bl/6 mice (8-12 wk of age) (Charles River Laboratories, St-Constant, QC, Canada) as described^{29,30}, with minor modifications. Briefly, BM cells were isolated by flushing femur and tibia from mice with 3ml of PBS supplement with 2% heat-inactivated FBS (BioMedia, Drummondville, QC, Canada). The BM cells were resuspended in Gey's solution with NH₄Cl for 3 min to lyse RBC. Cells were washed twice in 10ml of complete RPMI 1640 (BioMedia) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (BioMedia), 50 μ M 2-mercapthethanol (Sigma-Aldrich, Oakville, ONT, Canada) and antibiotics (100U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (Biosource, Montreal, QC, Canada)). BM cells were cultured at 2×10^6 cells/ml in 6-well plates in complete culture medium supplemented with 400 ng/ml recombinant murine Flt-3L (generated in house from Chinese hamster ovary cell-derived, kindly provided by Kenneth Basel). On day 3, the medium was gently exchanged to fresh medium supplement with Flt-3L. On day 5, non adherent cells were removed without dislodging clusters of developing DCs, and fresh medium was added supplement with Flt-3L. On day 7, *in vitro* activation was accomplished by adding 1 μ g/ml of LPS *Escherichia Coli* (O55:B55; Sigma-Aldrich) in FLDC culture for 24 h. The cells were washed twice with PBS and were recovered by adding 500ul of Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) 5 min at 37°C. FLDCs were then extensively washed at least 3 times with medium and were used as the tolerant FLDC group. As a naive control, FLDCs were cultured on day 7 with medium only for 24 h. The purity of cells was >90% of CD11c⁺ and were used as FLDCs. The Institutional Animal

Care Committee reviewed and approved all procedures performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines.

Flow cytometry

FLDCs were stained with varying combinations of mAbs following our procedure described in a previous study³¹ with minor modifications. The mAbs used to identify FLDC subsets generated were anti-mouse CD11c (BD Biosciences Pharmingen, Mississauga, ONT, Canada), anti-mouse CD24 (Myltinei Biotec, Auburn, CA, USA) and anti-mouse CD11b Abs (Myltinei Biotec) to identify FLDC subsets generated.

Immunoblotting

Naive and tolerant FLDCs were incubated in free FBS medium for 1 h as a resting time and stimulated with LPS (1 µg/ml) for the indicated time period. Reactions were halted by rapidly cooling on ice and these FLDCs were washed once with ice-cold PBS. FLDCs were lysed in sample buffer (SDS reducing buffer) and boiled at 95°C for 5 min. Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in running buffer (15g/L TrisBase, 72g/L glycine and 5g/L SDS) and transferred onto PVDF or nitrocellulose membrane (100 V, RT, 45 min). Membranes were blocked and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: anti-HDAC-1, anti-HDAC-2 and anti-HDAC 3 (rabbit polyclonal; Cell Signaling, Pickering, ONT, Canada) and phospho-p38 MAPK (rabbit polyclonal; BioSource, Camarillo, CA, USA). The membranes were subsequently incubated with a second antibody HRP-conjugated anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and visualized using Western Chemiluminescence ECL Plus detection reagents (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada) according to the manufacturer's protocol. X-Ray films were developed and quantitative analysis of detected bands

was carried out by densitometer scanning using BioRad scan (BioRad). Membranes that were probed with phospho-specific antibodies were stripped, blocked and probed with non-phosphorylated anti-p38 (Santa-Cruz Biotechnology) or anti-mouse actine (Amersham Biosciences).

Histone deacetylation activity

The effect of endotoxin tolerance on HDAC activity was carried out according to the instruction manual of the Colorimetric HDAC activity assay kit (BioVision, Mountain View, CA). Briefly, naive or tolerant FLDCs (4×10^6 cells/ml) were subjected to LPS stimulation ($1 \mu\text{g/ml}$) for 6 hours in complete medium. Cells were washed twice in cold PBS and resuspended in $75 \mu\text{L}$ of lysis buffer (50mM Tris HCl, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate sodium, 10% Glycerol, 1mM DTT). The lysis mixture was incubated on ice for 15 min and centrifuged for 10 min at 4°C . The HDAC assay, the reaction mixture contained protein extract from naive and tolerant FLDCs (75 μg protein) and substrate (Boc-Lys (Ac)-pNA, 10 mmol/L) in $100 \mu\text{L}$ total volume. After incubation for 2 hours at 37°C , the reaction was stopped by adding $10 \mu\text{L}$ of lysine developer and incubated at 37°C for 30 minutes. The HDAC activity was read in a plate reader at 405 nm. Each assay was done in duplicate from four different batches of cell extracts.

Immunoprecipitation – HDAC assay

15×10^6 cells/ml of either naive or tolerant FLDCs were stimulated with $1 \mu\text{g/ml}$ of LPS for 6 hours in complete medium. Cells were washed twice in PBS and extracts were prepared using $200 \mu\text{L}$ of stringent immunoprecipitation (IP) buffer (50mM Tris HCl, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate

sodium, 10% Glycerol and protease inhibitors (1mM PMSF, 0.5µg/ml leupeptid, 0.5µg/ml aprotinin)). The lysis mixture was incubated on ice for 10 min and vortexed for 15 seconds. Samples were returned on ice and vortexed every 10 min for a total of 30 min. Extracts were centrifuged for 10 min at 4°C and 300µg of protein was incubated with 2µg of antibody to precipitate HDAC1, HDAC-2 or HDAC-3 overnight at 4°C with rotation. Then, 45µL of pre-washed A/G agarose beads (Santa Cruz) was added to the immune complexes and incubated overnight at 4°C with rotation. The complexes were pelleted by gentle centrifugation for 5 min at 4°C, washed three times with 500µL of IP-buffer and once with HDAC buffer (10mM Tris HCl, 10mM NaCl, 10% Glycerol). The immunoprecipitates were resuspended in 50µL of HDAC buffer and subjected to HDAC activity assay according to the manufacturer's protocol (BioVision).

Measurement of IL-10 and IL-12 following HDAC modulation

Tolerant or naive FLDCs (2×10^5 cells/ml) were stimulated with LPS (1µg/ml) in complete RPMI1640 for 24h. Serial dilutions of recombinant cytokine standards and culture supernatants were added to individual wells in triplicate, and were subjected to quantification of the cytokine level of IL-12p40 and IL-10 by using specific ELISA kit using Mouse IL-12/IL-23 (total p40) and Mouse IL-10 ELISA ready Set-Go (eBioscience, San Diego, CA, USA). For HDAC inhibition experiments, TSA (Sigma) from 0, 12.5, 25, 50, 100 and 200 nM was added to culture of the same time as LPS was added for the second challenge for 24h. Theophylline (Sigma) was also used for HDAC activating experiments. FLDCs from tolerant group and naive group were stimulated with LPS (1µg/ml) in presence of theophylline concentrations from 5, 12.5, 25, 50 and 100 µM for 24h.

Statistical analysis

All data are expressed as mean +/- standard error of the mean (SEM). Data were analyzed by unpaired student's T-test or by ANOVA test and Bonferroni multiple comparison post test using on *Graph Pad InStat* software program.. Differences between groups were considered statistically significant when the probability that they occurred by chance was less than 5%.

RESULTS

Expression and regulation of histone deacetylases in FLDCs

Few studies have reported the contribution of HDACs to LPS-induced proinflammatory gene expression^{11,17,32,33}. Therefore, we hypothesized that regulation of HDAC expression by LPS might contribute to chromatin changes allowing proinflammatory response or endotoxin tolerance in DCs. We used FLDCs as an *in vitro* DC model based on an earlier study from our group (Patenaude J. *et al.*, in manuscript) and others studies³⁰ demonstrating their similarities with those *in vivo* conventional lymphoid-resident DCs. As shown in **Fig. 1**, two different populations constituted our CD11c⁺-FLDCs: 12% express CD45RA^{high}CD11c⁺ corresponding to plasmacytoid DCs and 59% express CD45RA^{low}CD11c⁺ as the conventional DCs (cDCs). As expected, our CD45RA^{low}CD11c^{high} cFLDCs could be divided into two separately population defined as CD24^{high}CD11b^{low} DCs subsets and CD24^{low}CD11b^{high} which referred to CD8⁺ cDCs and CD8⁻ cDCs respectively (**Fig. 1**).

We then analyzed HDAC-1, HDAC-2 and HDAC-3 expression in FLDCs over a LPS time course. LPS treatment transiently repressed expression of HDAC-1 and in a lesser way HDAC-2 and HDAC-3 at time points 2h and 4h (**Fig. 2**). By 6h of LPS treatment, HDAC-1, -2 and -3 protein levels had returned to normal level compared to unstimulated state (**Fig. 2**). These results indicated that LPS-mediated tolerance altered HDAC function in FLDCs.

HDAC expression and activity in tolerance induction

As class I member HDACs are modulated following LPS stimulation of macrophages and DCs³², we wanted to assess their relative expression in LPS tolerance induction of FLDCs. As shown in **Fig. 3A**, LPS-tolerance did not induce significant changes in neither HDAC-1, HDAC-2 nor HDAC-3 expression at any time points.

Even though LPS tolerance induction did not modify HDAC expression, it could affect their deacetylase activity, which might impact proinflammatory gene expression. Therefore, we investigated total and specific HDAC activity between both groups. As shown in **Fig. 3B**, an increase of HDAC activity was noted in the tolerant group as compared to the naive group in the unstimulated state and following 6h of LPS stimulation. When we looked at specific HDAC subtype activity, we noted only an increase of HDAC-2 activity in LPS-stimulation tolerant FLDCs (**Fig. 3C**). Surprisingly, HDAC-1 and HDAC-3 activities were down-regulated or unchanged respectively following LPS stimulation of tolerant FLDCs as compared to naive FLDCs. These results showed that HDAC expression does not necessarily correlate with their enzymatic activity.

HDAC inhibitor TSA suppressed profoundly the secretion of IL-12p40 of either LPS-stimulated naive or tolerant FLDCs

To determine whether histone acetylation or chromatin modifications by HDACs contribute to LPS insensitivity in tolerant FLDCs, we incubated these cells with LPS for 24h with increasing doses of TSA (from 12.5 nM to 200 nM), an HDAC inhibitor. As we have noted in a previous study, unstimulated tolerant FLDCs produced significantly higher quantity of IL-12p40 as compared to naive group; $2260.37 \pm$

453.44 pg/ml and 833.63 ± 155.43 pg/ml respectively. After LPS treatment, we detected an IL-12p40 concentration around 5786.08 ± 542.85 pg/ml for tolerant group, which represented an increase of 2.5 fold compared to a 12.2 fold increasing for naive group (Fig. 4, $p < 0.01$). As expected, the LPS tolerance induction exerted a significant inhibition of IL-12p40 synthesis in tolerant FLDCs as demonstrated by the lighter rise in IL-12 production. We found that lowest concentration of TSA (12.5nM) caused a marked 2-fold decrease of IL-12p40 secretion of both LPS-stimulated naive (10175.8 ± 917.1 vs 5945 ± 181.7 pg/mL, $p < 0.05$) and tolerant (5286.1 ± 542.9 vs 2469.7 ± 83.5 pg/mL, $p < 0.01$) FLDCs (Fig. 4). As shown in Fig. 4, IL-12p40 levels of LPS-stimulated naive FLDCs were dose-dependently decreased and reached 90% reduction (8635 ± 291.5 vs 978.1 ± 113.3 pg/mL, $p < 0.05$) in presence of the highest TSA concentration (200nM). However, 50 nM of TSA induced a total suppression of IL-12p40 secretion in LPS-stimulated tolerant FLDCs. TSA effect on IL-12p40 production of FLDCs was not due to an increase of cell death, since highest concentration of TSA alone induced a low mortality percentage of FLDCs similar to LPS treatment (data not shown). Low concentration of TSA causes a marked decrease of IL-12p40 production in both groups, which hypothesized to have an anti-inflammatory effect. However, our results demonstrate that tolerant FLDCs are more sensitive to HDAC inhibitor than naive FLDCs, leading HDACs a specific role in activating dendritic cells towards an immune stimulatory response.

Theophylline restored IL-12p40 secretion and increase p38 MAPK phosphorylation level in LPS-stimulated tolerant FLDCs

Low concentrations (10^{-6} mol/L) of theophylline increase HDAC activity and expression through an unknown mechanism³⁵. More specifically, theophylline is able

to restore the HDAC-2 activity and expression to normal in alveolar macrophages which restores the response of insensitive macrophages to corticosteroids and therefore, decrease inflammatory response in lungs³⁶. Increase dose of theophylline did not induce enhance cell death of our FLDCs, as compared to LPS exposition (data not shown). As we have observed suppression of IL-12p40 production by FLDCs with inhibited HDAC activity (TSA), we decided to use theophylline (from 5 μ M to 100 μ M) in our model of LPS tolerance induction. As shown in **Fig. 5A**, compared to LPS-stimulated cells alone after 24h, theophylline treatment (100 μ M) caused a slightly increase of IL-12p40 production by naive FLDCs (11822.8 \pm 211.3 vs 13084.8 \pm 582.1 pg/mL) without no significance. As we have noted previously, second exposure to LPS induced a significant inhibition of increase IL-12p40 levels in tolerant FLDCs compared to naive FLDCs (11822.8 \pm 211.3 vs 6792.7 \pm 525.7, $p < 0.001$) (**Fig. 5A**). Surprisingly, tolerant FLDC's capacity to produce IL-12p40 following LPS stimulation was restored in presence of increasing concentrations of theophylline (from 5 μ M to 100 μ M). Following 24h of LPS-stimulation with the highest theophylline concentration (100 μ M), we noted a significant increase up to 43% of IL-12p40 level production in tolerant FLDCs compared to tolerant FLDCs with LPS stimulation (6792.7 \pm 525.7 vs 10090.8 \pm 584.1 pg/mL, $p < 0.01$) (**Fig. 5A**). Decreased TLR4-induced IL-12p40 production after endotoxin tolerance is often associated with inhibition of p38 MAPK phosphorylation, as it was noted in **Fig. 5B** (naive FLDCs stimulated with LPS 30' versus tolerant 30' FLDCs). Treatment of LPS-stimulated tolerant FLDCs with theophylline restored the increase p38 phosphorylation at closely levels as in naive FLDCs (**Fig. 5B**). These results indicated that LPS-mediated tolerance altered HDAC functions in DCs. HDACs

might play a substantial role in IL-12p40 gene expression at the level of chromatin or by enhancing MAPK activity which is dysregulated following endotoxin tolerance.

DISCUSSION

Endotoxin tolerance associated with severe sepsis, results in gene expression reprogramming with decreased LPS-induced proinflammatory gene expression in response to TLR4 stimulation. Few studies have assessed the contribution of HDACs in LPS-induced endotoxin tolerance in DC lines. In this study, we found that decreased IL-12p40 production in LPS-stimulated tolerant FLDCs is associated with dysregulation of HDAC activity. Despite the literature implicating HDACs as negative regulators of TLR-inducible genes¹², we have showed here that HDACs are required for efficient IL-12p40 gene expression following second TLR-4 stimulation of tolerant FLDCs with LPS. By using the class I and II deacetylase inhibitor, TSA, IL-12p40 production was decreased in both groups of FLDCs. These results confirm HDAC's role in LPS-induced IL-12p40 production in FLDC endotoxin tolerance induction. In contrast, treatment of tolerant cells with theophylline simultaneously with second LPS stimulation restored IL-12p40 production via increased p38 MAPK phosphorylation. These results demonstrate that endotoxin tolerance induction in DCs correlate not only with decreased TLR-4 intracellular pathway activation but also with chromatin alterations of IL-12p40 gene expression caused by dysregulation of HDAC activity.

Control of gene expression is a critical step in the regulation of the cellular inflammatory response and is mediated by both transcription factors and chromatin structure modifications. Acetylation is one of the most widely studied histone modifications and is controlled by the balance of HATs and HDACs. It is known that a predominance of HDAC activity induces a histone hypoacetylation which is primarily time associated with subsequent gene silencing. In contrast, HDAC

inhibition caused histone hyperacetylation that is associated with unwinding of the DNA and transcriptional activation. Our results suggested that LPS hyporesponsiveness of FLDCs is associated with altered HDAC activity that could result in important chromatin modifications of the IL-12p40 gene. We have in a previous study, observed this LPS hyporesponsiveness phenomenon in DCs isolated of burned mice. The decreased LPS-induced IL-12p40 cytokine secretion of burned DCs and tolerant FLDCs could correlate with epigenetic modifications. A recent study has shown epigenetic modifications, such as a substantial decrease of methylation histone H3 (Lys³⁶) and acetylation of histone H3 (Lys¹⁴) in the thymus after burn injury³⁷. They hypothesized that these histone modifications in the thymus caused the decreased number of cells in the S phase and the increased apoptosis in the thymus post-injury associated with the immunosuppression state. It was noted in LPS-tolerant THP-1 cells a persistent methylation of histone H3 (Lys⁹), reduced phosphorylation of histone H3 (Ser¹⁰), disruption of NF- κ B p65 recruitment to promoter and concomitant binding of transcriptional repressor RelB⁶. These changes in chromatin structure contributed to silencing TNF- α expression in cells which demonstrated an important role for epigenetic modifications in the process of endotoxin tolerance. Therefore, epigenetic modifications are implicated in the transcriptional expression of inflammatory genes and could be regulated by the HDAC action.

Aung and *al.* have shown that LPS stimulation induced different patterns of HDAC mRNA gene expression in bone-marrow macrophages (BMM)³². They observed that LPS transiently repressed expression of several of the class II member HDACs (*Hdac-4, 5, 6 and 7*) at time points (4, 6 h) that correlated with maximal gene expression. However, the *Hdac-1* mRNA expression (class I member HDAC) was increased

within 4 h to 8 h following LPS stimulation. This increase occurred at the same time they observed up-regulation of the histone acetyltransferases CBP, p300 and P/CAF mRNAs (7 h) followed by the subsequent decrease of Cox-2 gene expression (8-24 h). Therefore, Aung and colleagues have proposed a correlation between elevated *Hdac-1* expression and repressed Cox-2 gene expression in LPS-stimulated macrophages³². Consistent with this hypothesis, the decay in mRNA expression of Cox-2 was prevented by treatment with TSA (class I member inhibitor) of LPS-stimulated BMM. Conversely, they have shown that TSA treatment on LPS-stimulated BMM reduced substantially the level of *Ccl-2*, *Ccl-7* and *Edn-1* mRNAs, important proinflammatory chemokines. They explained this by the fact that TSA down regulated PU.1 expression and therefore inhibited PU.1-dependant target genes such as *Ccl-2* and *Ccl-7*. It could also mean that HDACs can positively regulate gene expression depending of the gene studied. Moreover, TSA concentrations used in this study were very high (0.75 to 1.5 μ M) and could explain the inhibition of PU.1 and ERK1/2 expression, which was not observed in studies using lower TSA concentrations¹¹. We have also observed that TSA concentrations within 5nM to 100nM did not increase cell mortality (data not shown), which represented the range of concentration selected for evaluating HDAC's role on the inflammatory response.

Recent studies have revealed HDAC's role in efficient TLR-mediated induction of IL-12p40 in BMDCs and macrophages^{11,38}. Similarly to our results, small concentrations of either TSA or SAHA significantly reduced IL-12p40 secretion in LPS-stimulated BMDCs. Using ChIP-assays they have shown that TSA and SAHA abrogated TLR-induced Rel-A and IRF-1 but not C/EBP recruitment to IL-12p40 promoter following stimulation with CpG-DNA¹¹. Rel-A, IRF-1, C/EBP are essential co-factors recruited

to regulatory regions within the IL-12p40 promoter to promote gene expression³⁹. HDAC inhibitors also significantly reduced CpG-DNA induced chromatin remodelling that might explained the inhibitory effect on co-factor recruitment¹¹. Other studies have revealed the implication of HDAC in co-factor recruitment of c-jun-dependant genes. Yamaguchi and *al.* have showed that phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) –induced expression of cyclooxygenase-2 (Cox-2), cyclin D1 and collagenase-1, were all strongly inhibited by TSA and SAHA⁴⁰. It was also demonstrated that TSA reduced RNA-polymerase II recruitment to the ISG54 promoter resulting in inhibition of selected INF- β -stimulated immediate early genes⁴¹. On the other hand, a recent paper has demonstrated the benefit used of SAHA following severe trauma⁴². SAHA normalized TNF- α levels following haemorrhage and from a LPS second hit in rats. All these studies demonstrate that class I HDAC inhibitors play a substantial role in inflammatory gene regulation without affecting TLR-induced signalling pathways, such as MAPK activation.

Other than the cytokine IL-12p40, other cytokines/chemokines such as IL-12p35, INF- β , IP-10, MCP5, inducible nitric oxide synthetase and co-stimulatory molecules of BMDCs are all inhibited by HDAC inhibitors^{11,33}. Brogdon and colleagues have demonstrated that HDAC activities are required for TLR4-dependent DC-mediated Th1, but not for Th2, effector cell activation and migration³³. In presence of LAQ824, a specific HDAC inhibitor, LPS-treated DCs were not able to increase INF- γ secretion by Th1 cells in a dose-dependant manner. In contrast, when Th2 effector cells were incubated with stimulated DCs and LAQ824, IL-4 secretion was unchanged at any LAQ824 concentrations. This Th response imbalance of LPS-stimulated DCs in presence of LAQ824 was associated with decreased IL-12p40, CD40 expression and

cell chemotaxis³³. Therefore, HDACs play a substantial role in regulating pro-inflammatory gene following TLR stimulation of DCs and initiating a Th1 response consistent with our results. Our findings support this hypothesis since we restored LPS-induced IL-12p40 secretion in tolerant cells when treated with class I HDAC activator theophylline.

Theophylline is a bronchodilator which at lower concentrations, with dexamethasone, has anti-inflammatory effect in asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)³⁴. Its effect is due to a direct effect on HDAC activity, resulting in suppression of inflammatory genes and enhancement of the anti-inflammatory effects of corticosteroids. It is known that inflammation in COPD is unresponsive to corticosteroids. Therefore, theophylline restores dexamethasone sensitivity in alveolar macrophages of smokers or in COPD via HDAC-2 activity and reduced inflammatory cytokine IL-8 release. However, it was observed that theophylline (10^{-6} M) alone increases IL-8 level in macrophage-like U937 cells and total HDAC activity³⁶. The increased HDAC activity was related to an enhancement of both HDAC-1 and HDAC-2 activities. Corroborating our findings, theophylline had positive effects on inflammatory gene expression probably by increasing class I member HDAC activity. This is the first study to show that theophylline abrogated LPS effects on tolerant FLDCs and increase the level of IL-12p40 secretion in TLR4-stimulated cells. Increased HDAC activity, following theophylline treatment, up-regulated LPS-mediated phosphorylation of p38 MAPK of tolerant DCs. HDACs are phosphoproteins whose activity is modified according to their phosphorylation status⁴³. Ito et al. have shown that the effect of theophylline was mediated, at least in part, by p38 MAPK³⁵. They also found consensus phosphorylation sites within HDAC1,

HDAC2, and HDCA3. However, a p38 MAPK docking site was detected only within HDAC3, and a potential docking site was found within HDAC1 but not within HDAC2. Therefore, theophylline could enhance p38 MAPK phosphorylation in our LPS-stimulated tolerant FLDCs, which would allow increased HDAC activity. Enhanced HDAC activity could restore co-factors recruitment to IL-12p40 promoter and further IL-12p40 secretion in tolerant FLDCs. Moreover, increased p38 MAPK phosphorylation must be implicated directly in the increase IL-12p40 production of tolerant FLDCs by transcription factors recruitment (CREB, AP-1)³⁹. Further studies will be needed to elucidate the specific impact of theophylline on HDAC expression and activity following inflammatory response as well as endotoxin tolerance.

In this paper, we present evidence that endotoxin tolerance modulates properties of HDAC activity at the chromatin level and thereby decreases IL-12p40 gene expression of tolerant DCs. We offer some possible mechanisms through which endotoxin tolerance could attenuate the inflammatory response, namely through dysregulation of HDAC activity. This is the first study that demonstrated the use of theophylline as an immunostimulatory agent on DCs. However, we realize that a number of questions remain unanswered, and better characterization of specific HDAC role is essential for the development of more specific pharmacological interventions that can prevent and even reverse the appearance of LPS hyporesponsiveness following severe trauma such as hemorrhagic shock, burn injury and SIRS.

FIGURES**Figure 1: Surface markers on FL cultures isolated on day 6 of the differentiation.**

FLDC cultures were also stained with the indicated combinations of surface markers for DC subtypes. Cells were also gated on the CD11c⁺ population and their expression of CD24 and CD11b molecules determined using flow cytometry. The results were analyzed by flow cytometry using WinMdi software. All experiments were performed at least three times with similar results.

Figure 2: Regulation of HDAC expression by LPS stimulation in FLDCs.

FLDCs were stimulation with LPS (1µg/ml) for 0, 2, 4 and 6 h. Protein levels were quantified by western blot using specific Abs as mentioned in *Material and Methods*. Data are presented of three independent experiments.

Figure 3: LPS-tolerant cells exhibit HDAC expression and activity modification pattern.

The tolerant FLDCs were pre-treated with LPS (1µg/ml) for 18 hours. Tolerant-FLDCs were washed extensively and the cultured with LPS for additional 0, 2, 4 or 6 hours. As a naive group, FLDCs were cultured with medium alone for the first 18 hours. (A) HDAC-1, -2 and -3 expression profile of naive and tolerant FLDCs was quantitated by western blot. Data were normalized to total actin. (B) Total HDAC activity was evaluated in both naive and tolerant FLDCs by using colorimetric assay kit as mentioned in *Material and Methods*. Data are presented as mean value ± SEM of four independent experiments; ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$, using an ANOVA test with a Bonferroni post test to compare LPS-stimulated naive FLDCs vs tolerant FLDCs. (C) HDAC-1, HDAC-2 and HDAC-3 activity was assessed as

described in *Material and Methods*. Data are presented of three independent experiments.

Figure 4: TSA inhibits TLR-induced IL-12 secretion in both naive and tolerant FLDCs. Both naive and tolerant FLDCs were incubated with the histone deacetylase inhibitor TSA at different concentrations (12.5, 25, 50, 100 and 200 nM) and stimulated with LPS (1µg/ml) for 24 hours. Levels of IL-12p40 in culture supernatants were estimated by ELISA. Data are presented as mean value ± SEM of three independent experiments (n = 3 per experiment); ** $p < 0.01$ using an ANOVA test with a Bonferroni post test to compare LPS-stimulated naive FLDCs vs tolerant FLDCs.

Figure 5: Theophylline restores LPS-induced IL-12 production in tolerant FLDCs associated with an enhancement of p38 MAPK phosphorylation level. (A) Naive and tolerant FLDCs were incubated with histone deacetylase activator Theophylline at different concentration (5, 12.5, 25, 50 and 100 µM) and stimulated with LPS (1µg/ml) for 24 hours. Data are presented as mean value ± SEM of three independent experiments (n = 3 per experiment); ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ using an ANOVA test with a Bonferroni post test to compare LPS-stimulated naive FLDCs vs tolerant FLDCs. (B) The tolerant FLDCs were pretreated with LPS (1µg/ml) for 18 hours. Tolerant-FLDCs were washed extensively and the cultured with LPS (1µg/ml) and theophylline (25 µM) for the indicate times. As a naive group, FLDCs were cultured with medium alone for the first 18 hours. P38 MAPK phosphorylation was measured by Western blot as mentioned in *Material and Methods*.

References

1. Medvedev A.E., Kopydlowski K.M., & Vogel S.N. (2000) Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol* **164**, 5564-74.
2. Medvedev A.E., Lentschat A., Wahl L.M., Golenbock D.T., & Vogel S.N. (2002) Dysregulation of LPS-induced Toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor-associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells. *J Immunol* **169**, 5209-16.
3. Cavailon J.M. & Adib-Conquy M. (2006) Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care* **10**, 233.
4. Liew F.Y., Xu D., Brint E.K., & O'Neill L.A. (2005) Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* **5**, 446-58.
5. Foster S.L., Hargreaves D.C., & Medzhitov R. (2007) Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* **447**, 972-8.
6. El Gazzar M., Yoza B.K., Hu J.Y., Cousart S.L., & McCall C.E. (2007) Epigenetic silencing of tumor necrosis factor alpha during endotoxin tolerance. *J Biol Chem* **282**, 26857-64.
7. Kuo M.H. & Allis C.D. (1998) Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* **20**, 615-26.
8. Saccani S., Pantano S., & Natoli G. (2002) p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment. *Nat Immunol* **3**, 69-75.
9. Roth S.Y., Denu J.M., & Allis C.D. (2001) Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **70**, 81-120.
10. de Ruijter A.J., van Gennip A.H., Caron H.N., Kemp S., & van Kuilenburg A.B. (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* **370**, 737-49.
11. Bode K.A., Schroder K., Hume D.A., Ravasi T., Heeg K., Sweet M.J., & Dalpke A.H. (2007) Histone deacetylase inhibitors decrease Toll-like receptor-mediated activation of proinflammatory gene expression by impairing transcription factor recruitment. *Immunology* **122**, 596-606.
12. Lu J., Sun H., Wang X., Liu C., Xu X., Li F., & Huang B. (2005) Interleukin-12 p40 promoter activity is regulated by the reversible acetylation mediated by HDAC1 and p300. *Cytokine* **31**, 46-51.
13. Vanden Berghe W., De Bosscher K., Boone E., Plaisance S., & Haegeman G. (1999) The nuclear factor-kappaB engages CBP/p300 and histone acetyltransferase activity for transcriptional activation of the interleukin-6 gene

- promoter. *J Biol Chem* 274, 32091-8.
14. Minucci S. & Pelicci P.G. (2006) Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 38-51.
 15. de Ruijter A.J., van Gennip A.H., Caron H.N., Kemp S., & van Kuilenburg A.B. (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 370, 737-49.
 16. Reilly C.M., Mishra N., Miller J.M., Joshi D., Ruiz P., Richon V.M., Marks P.A., & Gilkeson G.S. (2004) Modulation of renal disease in MRL/lpr mice by suberoylanilide hydroxamic acid. *J Immunol* 173, 4171-8.
 17. Leoni F., Zaliani A., Bertolini G., Porro G., Pagani P., Pozzi P., Dona G., Fossati G., Sozzani S., Azam T., Bufler P., Fantuzzi G., Goncharov I., Kim S.H., Pomerantz B.J., Reznikov L.L., Siegmund B., Dinarello C.A., & Mascagni P. (2002) The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2995-3000.
 18. Choi J.H., Oh S.W., Kang M.S., Kwon H.J., Oh G.T., & Kim D.Y. (2005) Trichostatin A attenuates airway inflammation in mouse asthma model. *Clin Exp Allergy* 35, 89-96.
 19. Camelo S., Iglesias A.H., Hwang D., Due B., Ryu H., Smith K., Gray S.G., Imitola J., Duran G., Assaf B., Langley B., Khoury S.J., Stephanopoulos G., De Girolami U., Ratan R.R., Ferrante R.J., & Dangond F. (2005) Transcriptional therapy with the histone deacetylase inhibitor trichostatin A ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 164, 10-21.
 20. Saemann M.D., Bohmig G.A., Osterreicher C.H., Burtscher H., Parolini O., Diakos C., Stockl J., Horl W.H., & Zlabinger G.J. (2000) Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. *FASEB J* 14, 2380-2.
 21. Ito K., Lim S., Caramori G., Cosio B., Chung K.F., Adcock I.M., & Barnes P.J. (2002) A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8921-6.
 22. Tomita K., Chikumi H., Tokuyasu H., Yajima H., Hitsuda Y., Matsumoto Y., & Sasaki T. (1999) Functional assay of NF-kappaB translocation into nuclei by laser scanning cytometry: inhibitory effect by dexamethasone or theophylline. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359, 249-55.
 23. Toliver-Kinsky T.E., Lin C.Y., Herndon D.N., & Sherwood E.R. (2003) Stimulation of hematopoiesis by the Fms-like tyrosine kinase 3 ligand restores bacterial induction of Th1 cytokines in thermally injured mice. *Infect Immun* 71, 3058-67.

24. Toliver-Kinsky T.E., Varma T.K., Lin C.Y., Herndon D.N., & Sherwood E.R. (2002) Interferon-gamma production is suppressed in thermally injured mice: decreased production of regulatory cytokines and corresponding receptors. *Shock* **18**, 322-30.
25. Kawasaki T., Choudhry M.A., Schwacha M.G., Fujimi S., Lederer J.A., Bland K.I., & Chaudry I.H. (2008) Trauma-hemorrhage inhibits splenic dendritic cell proinflammatory cytokine production via a mitogen-activated protein kinase process. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**, C754-64.
26. Kawasaki T., Fujimi S., Lederer J.A., Hubbard W.J., Choudhry M.A., Schwacha M.G., Bland K.I., & Chaudry I.H. (2006) Trauma-hemorrhage induces depressed splenic dendritic cell functions in mice. *J Immunol* **177**, 4514-20.
27. LaRue K.E. & McCall C.E. (1994) A labile transcriptional repressor modulates endotoxin tolerance. *J Exp Med* **180**, 2269-75.
28. Yoza B.K., Hu J.Y., Cousart S.L., & McCall C.E. (2000) Endotoxin inducible transcription is repressed in endotoxin tolerant cells. *Shock* **13**, 236-43.
29. Brasel K., De Smedt T., Smith J.L., & Maliszewski C.R. (2000) Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* **96**, 3029-39.
30. Naik S.H., Proietto A.I., Wilson N.S., Dakic A., Schnorrer P., Fuchsberger M., Lahoud M.H., O'Keeffe M., Shao Q.X., Chen W.F., Villadangos J.A., Shortman K., & Wu L. (2005) Cutting edge: generation of splenic CD8⁺ and CD8⁻ dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J Immunol* **174**, 6592-7.
31. Patenaude J., D'Elia M., Hamelin C., Garrel D., & Bernier J. (2005) Burn injury induces a change in T cell homeostasis affecting preferentially CD4⁺ T cells. *J Leukoc Biol* **77**, 141-50.
32. Aung H.T., Schroder K., Himes S.R., Brion K., van Zuylen W., Trieu A., Suzuki H., Hayashizaki Y., Hume D.A., Sweet M.J., & Ravasi T. (2006) LPS regulates proinflammatory gene expression in macrophages by altering histone deacetylase expression. *FASEB J* **20**, 1315-27.
33. Brogdon J.L., Xu Y., Szabo S.J., An S., Buxton F., Cohen D., & Huang Q. (2007) Histone deacetylase activities are required for innate immune cell control of Th1 but not Th2 effector cell function. *Blood* **109**, 1123-30.
34. Barnes P.J. (2003) Theophylline: new perspectives for an old drug. *Am J Respir Crit Care Med* **167**, 813-8.
35. Ito K., Lim S., Caramori G., Cosio B., Chung K.F., Adcock I.M., & Barnes P.J. (2002) A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8921-6.

36. Cosio B.G., Tsaprouni L., Ito K., Jazrawi E., Adcock I.M., & Barnes P.J. (2004) Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages. *J Exp Med* **200**, 689-95.
37. Jeong J., Adamson L.K., Greenhalgh D.G., & Cho K. (2004) Injury-associated differential regulation of histone expression and modification in the thymus of mice. *Exp Biol Med (Maywood)* **229**, 327-34.
38. Iwata K., Tomita K., Sano H., Fujii Y., Yamasaki A., & Shimizu E. (2002) Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, down-regulates interleukin-12 transcription in SV-40-transformed lung epithelial cells. *Cell Immunol* **218**, 26-33.
39. Plevy S.E., Gemberling J.H., Hsu S., Dorner A.J. , & Smale S.T. (1997) Multiple control elements mediate activation of the murine and human interleukin 12 p40 promoters: evidence of functional synergy between C/EBP and Rel proteins. *Mol Cell Biol* **17**, 4572-88.
40. Yamaguchi K., Lantowski A., Dannenberg A.J., & Subbaramaiah K. (2005) Histone deacetylase inhibitors suppress the induction of c-Jun and its target genes including COX-2. *J Biol Chem* **280**, 32569-77.
41. Sakamoto S., Potla R., & Larner A.C. (2004) Histone deacetylase activity is required to recruit RNA polymerase II to the promoters of selected interferon-stimulated early response genes. *J Biol Chem* **279**, 40362-7.
42. Sailhamer E.A., Li Y., Smith E.J., Shuja F., Shults C., Liu B., Soupir C., deMoya M., Velmahos G., & Alam H.B. (2008) Acetylation: a novel method for modulation of the immune response following trauma/hemorrhage and inflammatory second hit in animals and humans. *Surgery* **144**, 204-16.
43. Pflum M.K., Tong J.K., Lane W.S., & Schreiber S.L. (2001) Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. *J Biol Chem* **276**, 47733-41.

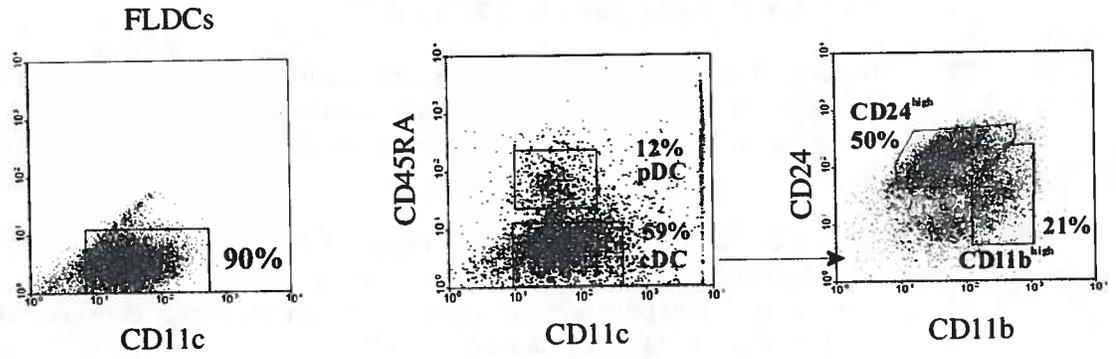
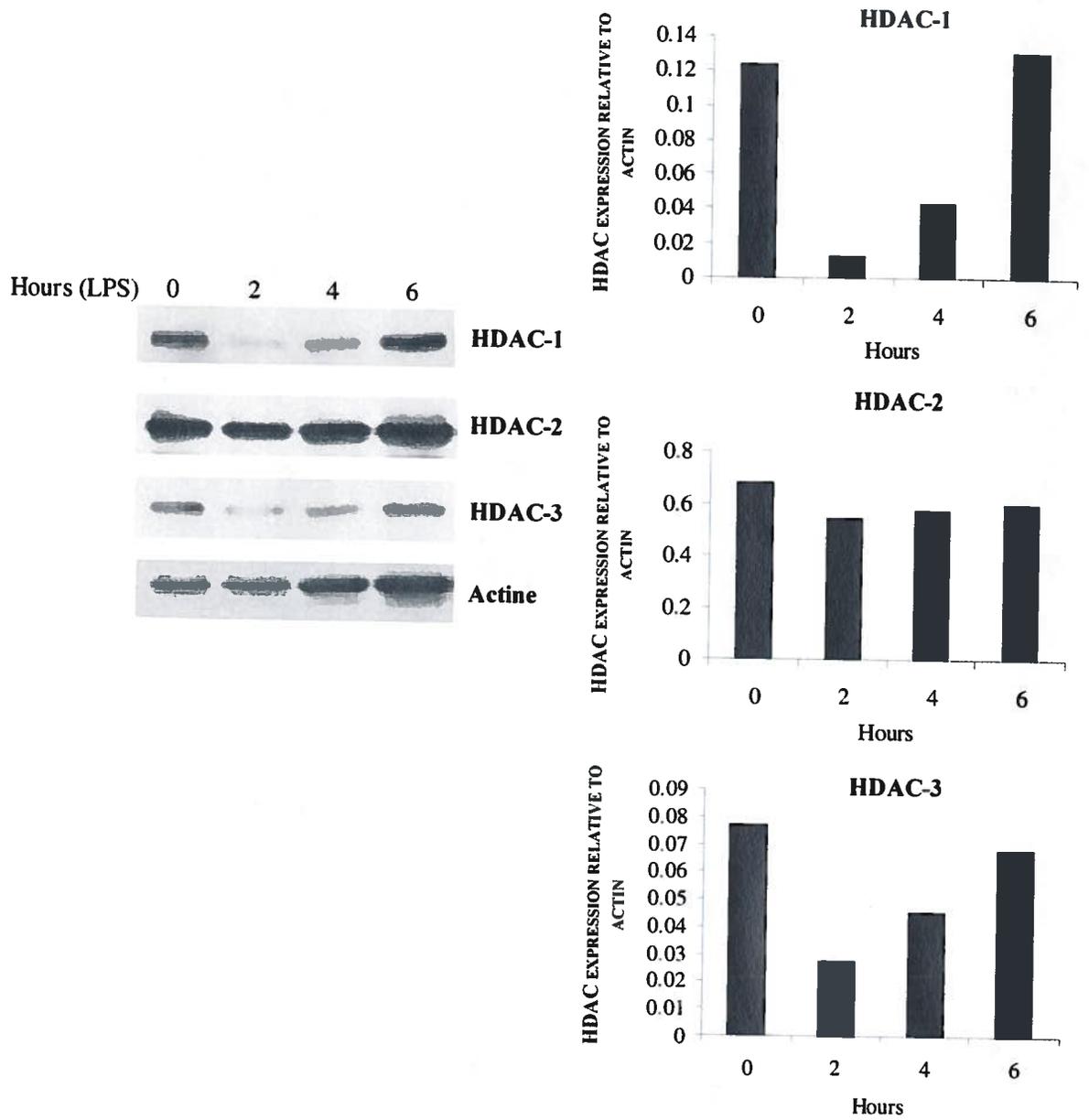
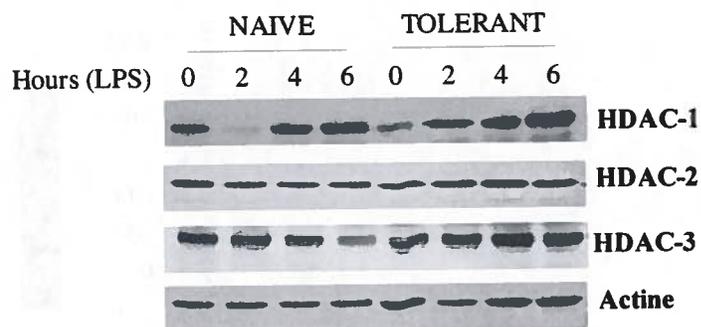


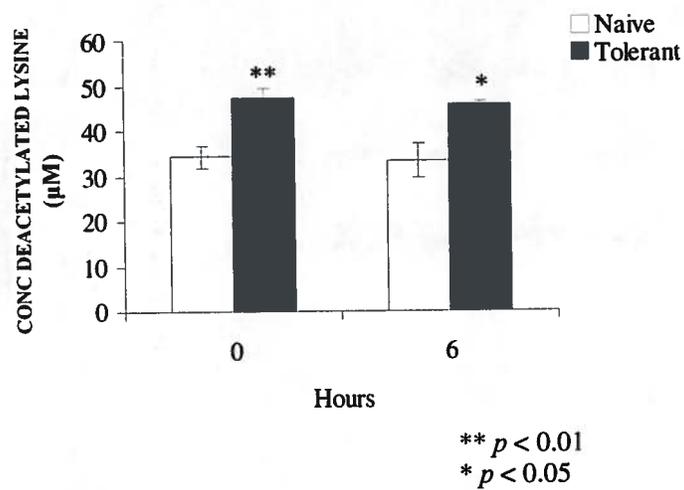
Figure 1

**Figure 2**

A.



B.



C.

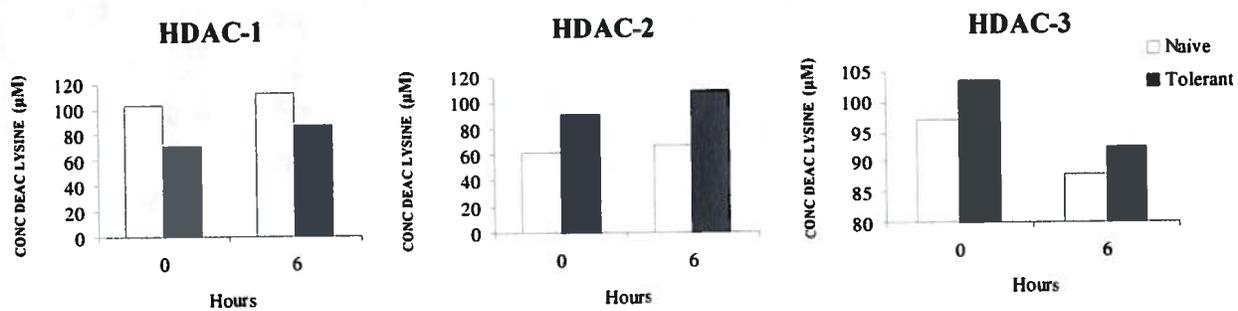


Figure 3

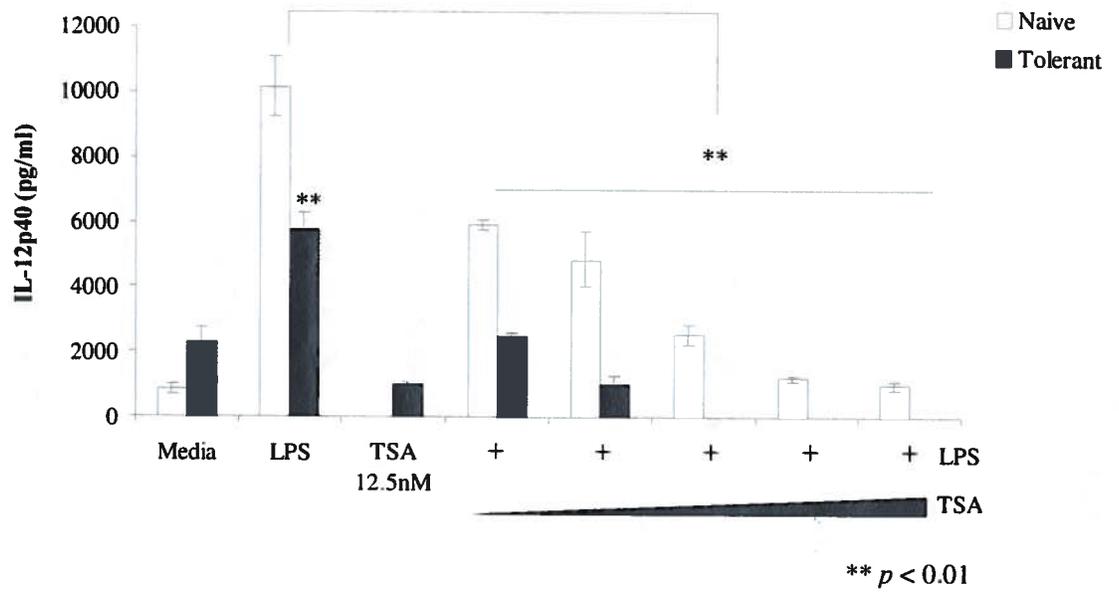
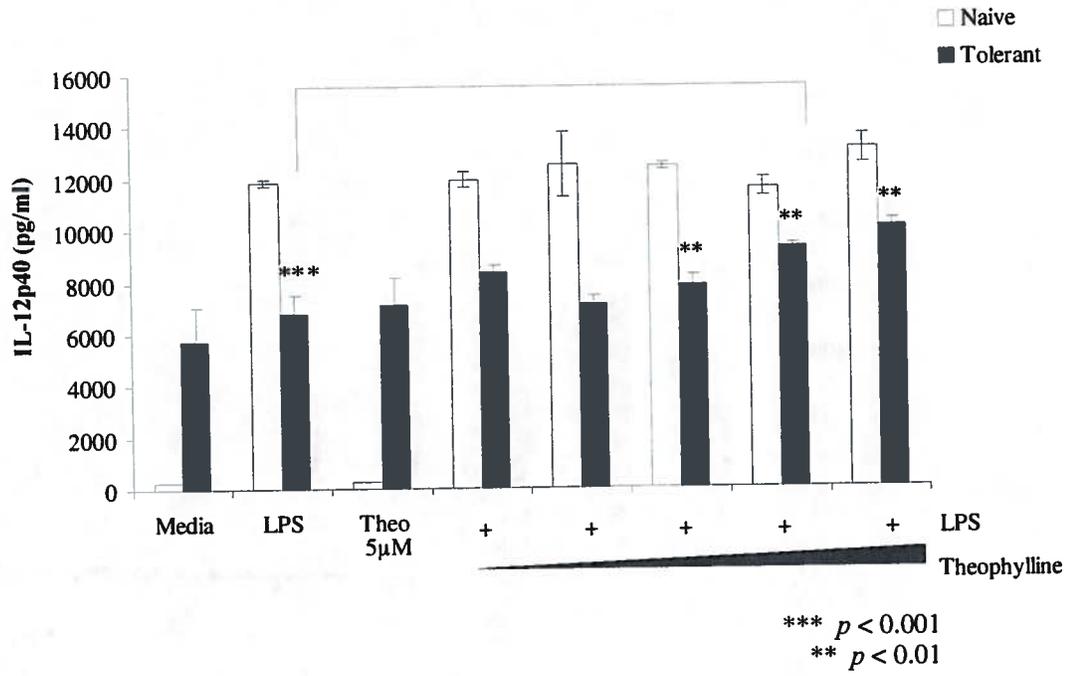


Figure 4

A.



B.

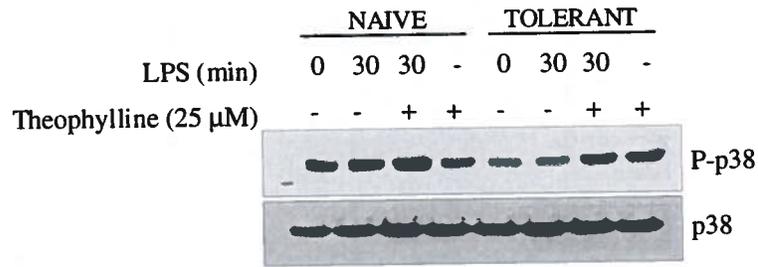


Figure 5



CHAPITRE 6 : DISCUSSION ET CONCLUSION

Le but de ce travail de recherche était de caractériser les compétences des CD4 durant la période CARS de la brûlure sévère. Ce travail a permis d'élucider les changements induits lors de cette reprogrammation défectueuse des CD4. Cette étude permettra de mieux comprendre le rôle des CD4 dans l'apparition de l'état d'immunosuppression suivant une brûlure sévère et d'innover au niveau de la recherche de nouveaux agents thérapeutiques.

La brûlure sévère et les cellules dendritiques

Les brûlures sévères entraînent des désordres systémiques importants incluant la suppression du système immunitaire qui résulte en l'apparition de septicémies (O'Sullivan et O'Connor, 1997; Mannick, Rodrick et Lederer, 2001). Les mécanismes responsables de cette suppression du système immunitaire à répondre aux infections secondaires sont d'origine multifactorielle et ne sont pas encore tous élucidés. Peu d'études ont rapporté le rôle des CD4 dans l'apparition de l'état d'immunosuppression. Nous avons donc utilisé le modèle murin de la brûlure sévère afin de caractériser les compétences des CD4 lors de la phase CARS suivant ce traumatisme. L'impact de la brûlure sévère sur les compétences des CD4 est biphasique. Chez les patients gravement brûlés (Vindenes, Ulvestad et Bjerknes, 1998b) (Yeh et al., 1997) (Yeh et al., 1999) et le modèle murin de la brûlure sévère (Ayala et al., 1991), il a été observé une augmentation de cytokines inflammatoires circulantes incluant l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- α quelques heures suivant la brûlure sévère (phase précoce). Toutefois, la source cellulaire de ces cytokines produites n'a pas été identifiée *in vivo*. Des expérimentations de stimulation *ex vivo* ont permis d'émettre l'hypothèse que les MAC et les CD4 seraient une des sources principales des cytokines pro-inflammatoires produites après le traumatisme (Paterson et al., 2003). Un autre fait appuyant cette hypothèse est que la région du traumatisme représente un environnement favorable à l'activation des CD4 et des MAC (Murphy et al., 2004). Chez le modèle du rat de la brûlure sévère, une augmentation de nécrose a été notée au pourtour de la plaie en deçà de 24 à 48 heures (Singer et al., 2008). En association avec cette nécrose, il a été observé une augmentation de l'expression *in situ* de la protéine HMGB-1 (*high-mobility group box-1*) dans le cytoplasme des

cellules nécrotiques. La libération de protéines, telles que HMGB-1 ou encore les HSP (HSP60, HSP70), suivant la nécrose cellulaire sont des ligands potentiels pour l'activation des TLRs sur les CD4 (Beg, 2002). Ces molécules libérées font partie intégrante des ligands endogènes DAMPs (Danger Associated-molecular pattern) libérés au cours de la mort cellulaire, du choc hémorragique ou de l'ischémie. On y retrouve l'ARN, l'ADN, les fragments de hyaluronate, l'héparine sulfate, la fibronectine et le fibrinogène. Il a été démontré que la HMGB1, la fibronectine, le surfactant A et les lipoprotéines sont les ligands endogènes de TLR4, l'ARN simple brin est celui de TLR7 et TLR8 et enfin l'ADN est celui de TLR9 (Beg, 2002). Le concept de base émis par Polly Matzinger est que les DCs perçoivent les dommages causés aux cellules, qu'il s'agisse de signaux issus directement des tissus lésés ou de médiateurs inflammatoires en réponse aux dommages subis par les cellules (Matzinger, 2002). Suivant une brûlure sévère, l'augmentation du nombre de bactéries d'origine intestinale dans la circulation (Deitch et Berg, 1987) et dans les organes lymphoïdes (Karabeyoglu et al., 2008) favoriserait aussi l'activation des CD4. Ainsi, une stimulation des CD4 via leurs TLRs pourrait expliquer en partie l'initiation de la réponse inflammatoire durant la phase précoce de la brûlure sévère (Paterson et al., 2003). Lors d'un choc septique, une diminution du nombre de CD4 en périphérie et dans les ganglions est observée dans les 24 heures suivant le traumatisme (Hiramatsu et al., 1997; Efron et al., 2004). Au niveau de la rate, cette suppression de CD4 a été observée entre 36 et 48 heures suivant le choc septique (Tinsley et al., 2003). Nous avons également noté une diminution du nombre de CD4 présentes dans la rate (**Article I/Figure 1**). L'hypothèse sous-jacente de ces observations serait que l'apoptose des CD4 spléniques résulte d'une forte activation de ces dernières dans les heures suivant la brûlure sévère. Par la suite, un rétablissement des sous-populations de CD4 résidant dans les organes lymphoïdes est observé. Toutefois, les mécanismes qui sont responsables de cette régénération de CD4 suivant un traumatisme (brûlure ou choc septique) sont encore inconnus.

Au 10^e jour suivant une brûlure sévère, nous avons observé une augmentation du nombre de CD4 présentes dans la rate (**Article I/Figure1**). Cette augmentation peut être associée à une augmentation de la migration des CD4 du site inflammatoire (plaie) vers les organes lymphoïdes secondaires, afin d'initier une réponse spécifique

des cellules T. L'injection sous-cutanée de microsphères fluorescentes (microsphères-FITC), au pourtour de la plaie, a permis de caractériser la migration des cellules CD. Nos résultats démontrent une augmentation de cellules CD11c⁺/microsphères-FITC dans la rate au 10^e jour suivant une brûlure sévère (Annexe/Figure 12). Tel que mentionné dans l'étude de Randolph, les cellules CD/microsphères-FITC⁺ dans les organes lymphoïdes sont la résultante d'une migration des dCDs, qui ont préalablement phagocyté les microsphères au niveau du derme (Randolph et al., 1999). Cette étude avait démontré que la présence de CD/microsphères-FITC⁺ dans les ganglions était bien la résultante d'une migration des cellules et non de la migration des particules fluorescentes seules, où elles seraient par la suite phagocytées par les CD résidentes. Suivant une brûlure sévère, un pourcentage de CD reconnaîtraient les pathogènes dans les tissus périphériques et migreraient vers les organes lymphoïdes (Shklovskaya, Roediger et Fazekas de St Groth, 2008). Toutefois, nos résultats ne nous permettent pas de conclure que ces CD migratoires participent à la présentation antigénique et à l'activation des cellules T dans les organes lymphoïdes.

Outre la migration des CD, une augmentation de précurseurs au site de l'inflammation et/ou dans les organes lymphoïdes pourrait expliquer la hausse de CD. Il a été observé, entre le 3^e et le 8^e jour suivant une brûlure sévère, une augmentation de précurseurs CMP et de monocytes au niveau de la moelle osseuse et de la rate (Santangelo, Gamelli et Shankar, 2001; Noel et al., 2007). Ces groupes de recherche en concluent que l'augmentation de monocytes/MAC, suivant une brûlure sévère, serait la conséquence d'une hausse de précurseurs CMP. Tel que mentionné précédemment, les CD peuvent se différencier à partir des précurseurs CMP (Manz et al., 2001a; Manz et al., 2001b; Traver et al., 2000). La hausse de ces précurseurs CMP dans la rate pourrait également être à l'origine de l'augmentation du nombre de CD. Ainsi, deux facteurs pourraient expliquer le nombre croissant de CD spléniques au 10^e jour suivant le traumatisme : une hausse de leur capacité migratoire et/ou une augmentation de précurseurs.

Suite à des injections de Flt-3L chez le modèle murin de la brûlure sévère, il a été observé un rétablissement de la réponse de type Th1 (IFN- γ , IL-12 et IL-15) et une augmentation du taux de survie suivant une infection (Toliver-Kinsky et al., 2005). Une augmentation de CD α^+ professionnelles et de cellules NK serait donc à l'origine du rétablissement de la réponse immunitaire lors de la phase CARS. Tel que démontré par l'équipe de Brasel, le ligand Flt-3L permet l'expansion des deux sous-populations de CD α , soit les CD α^+ et les CD α^- (Brasel et al., 2000). Ces sous-populations de CD α ont des rôles respectifs dans l'activation des cellules T, c'est-à-dire que les CD α^+ favorise une réponse Th1 alors que les CD α^- initie une réponse Th2 (Maldonado-Lopez et Moser, 2001; Maldonado-Lopez et al., 1999b; Maldonado-Lopez et al., 1999a). Nous avons donc vérifié si la brûlure sévère affecterait différemment ces deux sous-populations de CD α lors de la phase CARS. Nous avons démontré que l'activation de la sous-population de CD α^+ était réprimée au 10^e jour de la brûlure sévère. Bien qu'aucune différence n'ait été notée quant à la distribution des CD α^+ versus CD α^- suite au traumatisme (**Article I/Figure 6A**), nous avons observé que l'expression du TLR4/MD-2 était diminuée uniquement chez les CD α^+ (**Article I/Figure 6B**). Cette inhibition du TLR4/MD-2 était soutenue et ce, même après une stimulation *ex vivo* aux LPS (**Article I/Figure 7A**). Nous avons donc démontré que la brûlure sévère affectait spécifiquement une sous-population de CD α de la rate.

Une perturbation de l'activation des CD α^+ , cellules productrices d'IL-12, pourrait expliquer en partie l'inhibition d'une réponse Th1 adéquate lors d'une seconde infection durant la phase CARS de la brûlure sévère. Afin de supporter cette hypothèse, nous avons mesuré les niveaux intracellulaires d'IL-12p40 chez les deux sous-populations comme paramètre d'activation de la voie du TLR4. La brûlure sévère induit une altération de l'activation de la cascade du TLR4 des CD α^+ observée par une diminution des niveaux intracellulaires d'IL-12 (**Article I/Figure 8A**). Tel qu'il a été noté par l'équipe de Maldonado-Lopez (Maldonado-Lopez et al., 2001), les CD α^- produisent également de l'IL-12 mais à moindre niveau que les CD α^+ . Nos résultats ont démontré que la brûlure sévère n'affectait pas la synthèse d'IL-12 des CD α^- (**Article I/Figure 8B**). Nous avons démontré que le

traumatisme de la brûlure sévère altérerait les fonctions des CD8 α^+ . Il a été noté que seule la sous-population de CD8 α^+ était affectée en comparaison avec la sous-population de CD8 α^- , chez des souris soumises à un sepsis subléthal par ligature et ponction caecal (Pene et al., 2009). Les niveaux élevés d'IL-10 lors de la réaction CARS suivant une brûlure sévère pourraient aussi expliquer l'inhibition fonctionnelle des CD8 α^+ . Il a été démontré que l'IL-10 favorise l'activation des CD8 α^- à initier une réponse de type Th2 et induit l'apoptose des CD8 α^+ (Boonstra et al., 2006). Somme toute, une baisse significative de la production d'IL-12 associée à une hausse d'IL-10 par les CD8, favorise une suppression de la réponse de type Th1 et l'induction d'une réponse Th2. Lors d'infections subséquentes, les CD8 des patients brûlés ne permettraient pas d'initier une réponse inflammatoire adéquate, d'où l'apparition de septicémies durant la phase CARS. Maintenant qu'il est possible d'isoler les deux sous-populations de CD8 spléniques, il serait essentiel d'étudier les compétences des CD8 α^+ versus celles des CD8 α^- suivant le traumatisme de la brûlure sévère. Ces résultats permettraient de caractériser plus précisément le rôle des sous-populations de CD8 dans l'immunomodulation suivant la brûlure sévère. Toutefois, nos observations permettent d'hypothétiser que des altérations au niveau de l'activité des CD8 α^+ seraient impliquées dans l'inhibition de la réponse Th1 d'où une incapacité à enrayer les pathogènes lors de la phase CARS. Nous pensons que le rétablissement d'une réponse Th1 chez le modèle murin de la brûlure sévère ayant reçu des injections de Flt-3L, serait associé à une récupération de l'activité des CD8 α^+ (Toliver-Kinsky et al., 2005).

Bien que l'importance d'avoir des CD8 fonctionnelles ait été démontrée dans le rétablissement d'une réponse Th1 lors de la période CARS (Toliver-Kinsky et al., 2005), les compétences de ces cellules durant cette période post-brûlure sont peu connues. Nous avons donc vérifié la capacité des CD8 spléniques à activer des hybridomes de cellules T CD4 $^+$, les BO97.11. Ces cellules T possèdent un TcR spécifique pour le peptide ovalbumine (OVA₃₂₃₋₃₃₉) (Hugo et al., 1992). L'utilisation d'un antigène peptidique assure la présentation de l'ovalbumine sur les complexes de CMH II et ainsi permet d'étudier les fonctions stimulatrices des CD8 suivant une stimulation du TLR4 (Dowling, Hamilton et O'Neill, 2008). Deux ligands spécifiques pour le TLR4, soient les LPS et le HSP60r, ont été utilisés (Article I/Figure 2). Les

LPS miment l'activation *in vivo* des CDs en présence de bactéries Gram⁻. Alors que les HSP60 sont des médiateurs libérés de cellules en nécrose, phénomène survenant après une brûlure sévère. Nous avons noté une augmentation d'HSP60 dans les splénocytes totaux de souris brûlés en comparaison avec le groupe témoin (Article I/Figure 2C). Cette hausse dans la rate peut être la résultante d'une augmentation de cette protéine dans les splénocytes. Elle peut être aussi la conséquence d'une libération accrue d'HSP60 dans la circulation sanguine, due à un accroissement de nécrose cellulaire suivant la brûlure sévère. D'ailleurs, nous avons tenté de doser la présence d'HSP60 plasmatique chez nos souris brûlés. Cependant, cette expérience ne fut pas concluante puisqu'une diminution significative des protéines plasmatiques est observée chez le groupe brûlé, due à une hausse de l'activité protéase (Rund, 1984). Tout comme les LPS, les HSP sont des activateurs des CDs, capables d'alerter précocement le système immunitaire adaptatif d'un danger, matérialisé par une nécrose cellulaire (Matzinger, 2002). Nos résultats ont démontré que les CDs du groupe brûlé sont moins compétentes à activer les cellules T BO97.11 suivant une stimulation du TLR4 (LPS ou HSP60r), (Article I/Figure 2B et 2D). Cette diminution a été observée par une baisse d'IL-2 sécrétée par les cellules T CD4⁺ BO97.11. L'impact d'une brûlure sévère sur les fonctions des CPAs (MAC ou CDs) a majoritairement été étudiée chez les splénocytes totaux, auxquels ont avait préalablement éliminé les lymphocytes (Kupper et al., 1985; Duan et al., 2008). Ainsi, l'isolement des CDs permet d'élucider spécifiquement le rôle de ces cellules dans la suppression de l'activation des cellules T, comme il a été observé chez le modèle murin du choc hémorragique (Kawasaki et al., 2006).

Durant une infection, les pathogènes activent les CDs via leur liaison aux TLRs initiant une cascade intracellulaire. Il a été observé chez les MAC une augmentation de l'expression du TLR4 et des médiateurs de la cascade intracellulaire suivant la brûlure ou lors d'un choc septique (Maung et al., 2005; Harter et al., 2004). Cette augmentation de la transduction du signal du TLR4 engendre une hausse d'IL-1 β , d'IL-6, de TNF- α , et de PGE₂ se résumant à l'hyperactivation des MAC. Toutefois, des études ont noté des différences entre l'activation des MAC et des CDs suivant un traumatisme sévère. Alors qu'il a été observé une activation excessive et non-

contrôlée des MAC suivant un choc septique, les fonctions des CD étaient plutôt réduites (Toliver-Kinsky et al., 2003; Laudanski et Wyczechowska, 2005). En accordance avec ces études, nos résultats montrent une baisse significative de l'expression génique et protéinique du TLR4/MD-2 chez les CD isolées du modèle murin de la brûlure sévère (**Article I/Figure 3A et 3B**). Une diminution de l'expression du TLR4/MD-2 a aussi été observée chez les CD suivant un choc hémorragique. Ces derniers résultats montrent que la brûlure sévère affecte négativement les CD via une perturbation de la transduction du signal du TLR4 (Kawasaki et al., 2008a). Ainsi, les CD des souris brûlés ne pourraient répondre adéquatement et initier l'activation des cellules T effectrices suivant une infection avec des pathogènes Gram⁻ ce qui pourrait expliquer l'apparition de septicémies.

Une stimulation adéquate du TLR4 chez les CD entraîne l'activation des MAP kinases qui sont essentielles à la maturation et à la production de cytokines immunostimulatrices/pro-inflammatoires (Dowling, Hamilton et O'Neill, 2008; Miyake, 2004). Afin de caractériser l'impact d'une brûlure sévère sur la voie d'activation du TLR4, nous avons étudié la phosphorylation des MAP kinases et la production de cytokines des CD stimulées *ex vivo* aux LPS. Au niveau basal, nous avons noté une hausse significative de la forme phosphorylée de la p38 MAPK chez les CD du groupe brûlé. Par la suite, nos résultats montrent qu'une stimulation du TLR4 induit une activation de la p38 MAPK et de la SAPK/JNK MAPK chez les CD du groupe brûlé semblable à celle observée chez les CD du groupe témoin (**Article I/Figure 5A et 5B**). Une étude précédente a démontré qu'une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires était associée à une activation de la p38 MAPK chez les MAC isolés du groupe brûlé (Maung et al., 2005). De part cette étude, nous pensons qu'en association avec l'activation de la p38 MAPK et de la JNK/SAPK MAPK, les CD isolées du groupe brûlé stimulées aux LPS produiraient plus d'IL-12p40 (Dowling, Hamilton et O'Neill, 2008). À l'opposé, nos résultats démontrent que suivant une stimulation du TLR4 les CD du groupe brûlé produisent significativement moins d'IL-12p40 en comparaison avec les CD du groupe témoin (**Article I/Figure 4B**). Associé à cette baisse d'IL-12p40, nous avons noté une hausse d'IL-10 sécrétée par les CD spléniques du groupe brûlé (**Article I/Figure 4B**).

Comment peut-on expliquer cette divergence entre l'activation des MAP kinases et les cytokines produites par nos CD_s suivant la brûlure sévère ? L'étude des différentes MAP kinases chez les CD_s serait nécessaire à la compréhension du rôle de ces protéines dans l'immunomodulation post-brûlure. Pour inhiber ces voies de signalisation, trois stratégies principales sont envisageables : des inhibiteurs pharmacologiques, des inhibiteurs plus spécifiques comme les oligonucléotides anti-sens, et la surexpression d'inhibiteurs physiologiques. L'implication de p38 MAPK et de JNK/SAPK MAPK dans les différentes étapes de l'inflammation a abouti à la synthèse de plusieurs inhibiteurs pharmacologiques pour la p38 de type imidazole, dont le SB203580, et d'inhibiteurs pour la JNK, dont le SP600125 (Nakahara et al., 2006). En présence de l'inhibiteur SB203580, une inhibition de la production d'IL-12p40 et d'IL-12p70 chez les CD_s, différenciées à partir de monocytes humains, stimulées en présence de LPS a été notée (Arrighi et al., 2001). Seule une inhibition de TNF- α et d'IL-12p70, mais pas d'IL-12p40, a été observée chez les CD_s stimulées aux LPS en présence d'un inhibiteur de la JNK MAPK (SP600125) (Nakahara et al., 2004). À l'opposé, l'utilisation d'inhibiteurs pour la voie de signalisation d'ERK1/2, tels que le PD98059 ou le U0126, a démontré que cette MAPK régulait négativement la production d'IL-12p70 et de l'IL-12p40 chez les CD_s stimulées aux LPS (Puig-Kroger et al., 2001). De plus, l'utilisation de l'inhibiteur U0126 a démontré qu'ERK1/2 MAPK était impliquée dans la production d'IL-10 chez les CD_s devenues tolérantes aux LPS (Yanagawa et Onoe, 2007). De part ces faits, la p38 et la JNK MAPK sembleraient favoriser une réponse de type Th1 alors qu'une activation de la voie ERK1/2 MAPK induirait une réponse de type Th2. Toutefois, certaines études ont démontré l'implication de la p38 dans l'initiation de la réponse de type Th2. Ainsi, il a été démontré que la p38 MAPK régule la production d'IL-10 chez les CD_s et les MAC stimulés aux LPS (Dowling, Hamilton et O'Neill, 2008; Ma et al., 2001). De plus, il a été observé que la production d'IL-10 chez les BMCD_s exposées à la protéine trichosanthine était dépendante de l'activation de la JNK/SAPK et de la p38 MAPK (Zhou et al., 2007). *In vitro*, le traitement des monocytes THP-1 avec des oligonucléotides anti-sens dirigés contre la JNK1 (46-kDa) et contre la JNK2 (54-kDa) a démontré que la JNK/SAPK MAPK régulait négativement la production d'IL-12p40 suivant une stimulation aux LPS (Utsugi et

al., 2003). De part ces faits, nous croyons que l'étude des MAP kinases par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques serait essentielle à la compréhension du rôle de ces protéines dans la production d'IL-12 versus d'IL-10 chez les CD4⁺ suivant la brûlure sévère. Outre l'implication spécifique des MAP kinases dans la synthèse d'IL-12 versus d'IL-10, l'augmentation de la forme phosphorylée de la p38 et de la JNK/SAPK associée à une diminution d'IL-12 et une augmentation d'IL-10 chez les CD4⁺ du groupe brûlé peut s'expliquer par le fait que nous avons étudié l'activation des MAP kinases sur notre population totale de CD4⁺. Ainsi, nous avons peut-être masqué une inhibition de la forme phosphorylée de ces protéines chez une sous-population de CD4⁺ (CD4⁺ et CD4⁻). Nous pensons que la brûlure sévère induit une suppression de la phosphorylation des MAP kinases chez les CD4⁺ ce qui expliquerait la diminution de la production d'IL-12p40 chez cette sous-population. Chez les CD4⁺ du groupe brûlé, l'augmentation de la p38 MAPK phosphorylée, pourrait être la résultante de l'activation des CD4⁻, qui sont en plus grand nombre dans la rate (**Article I/Figure 5A**) et productrices d'IL-10 (Maldonado-Lopez et al., 2001). Une diminution de la forme phosphorylée d'ERK1/2 MAPK a été notée chez les CD4⁺ du groupe brûlé versus le groupe témoin (**Article I/Figure 5C**). Il a été démontré que l'IL-10 a pour effet de diminuer l'activation de certaines voies de signalisation chez les monocytes/MAC (Lindmark et al., 1998). Chez les monocytes stimulés aux LPS et en présence d'IL-10, une inhibition de la phosphorylation d'ERK1/2 a été observée (Niuro et al., 1998; Kamimura et al., 2005). Tel que mentionné précédemment, des expérimentations utilisant des inhibiteurs spécifiques pour les MAP kinases devraient être faites afin de caractériser leur rôle respectif dans l'équilibre de la réponse Th1 versus Th2 médiée par les CD4⁺ lors de phase CARS.

À partir de nos résultats, nous sommes à même de conclure que la brûlure sévère induit une reprogrammation des CD4⁺ vers une réponse de type Th2 durant la phase tardive CARS (10^e jour). Tel qu'illustré à la **figure 9**, cette reprogrammation est associée à une altération de la transduction du signal via le TLR4 chez les CD4⁺ qui engendre une diminution d'IL-12p40 et une augmentation d'IL-10. L'induction d'un état tolérogénique des CD4⁺ lors de la phase CARS pourrait en partie expliquer la

suppression de la réponse de type Th1 et l'incapacité d'enrayer de nouveaux pathogènes, d'où l'apparition de chocs septiques après la brûlure sévère.

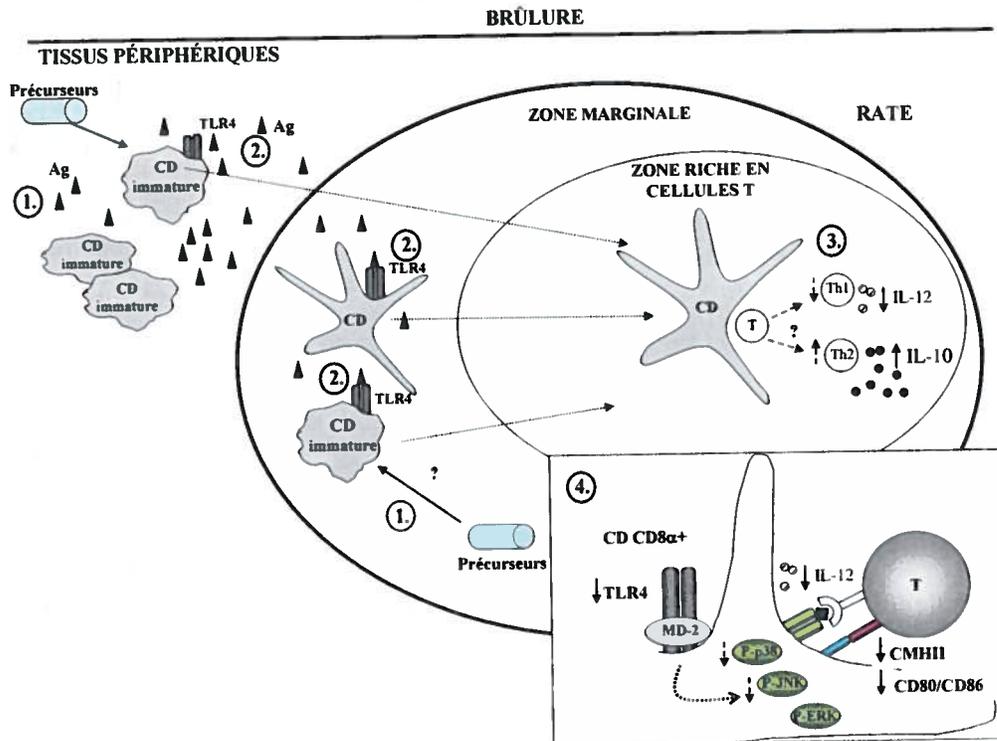


Figure 9 : Schématisation de l'impact d'une brûlure sévère sur les CD de la rate. Le traumatisme d'une brûlure sévère induit le recrutement de CD dans la rate au 10^e jour. (1) L'augmentation de CD dans la rate peut être la résultante d'une augmentation de la migration de CD de la périphérie vers la rate ou d'une hausse de CD différenciées à partir de précurseurs présents dans la rate. (2) L'augmentation de pathogènes circulants et/ou de motifs du danger peuvent activer les CD suite à leur liaison aux TLRs. (3) Une activation inappropriée du TLR4 des CD est observée au 10^e jour qui résulte en une inhibition de la synthèse d'IL-12p40 associée à une augmentation d'IL-10. (4) La brûlure sévère affecte une sous-population de CD dans la rate, les CD CD8α⁺. Une stimulation du TLR4 des CD CD8α⁺ cause une suppression de l'expression du TLR4/MD-2 et la production de cytokine IL-12p40. Une inhibition de la phosphorylation des MAP kinases (p38 ou SAPK/JNK) serait peut-être à l'origine de ces perturbations observées chez les CD CD8α⁺. La sous-population de CD CD8α⁺ serait donc impliquée dans la suppression d'une réponse Th1 au 10^e jour suivant le traumatisme, période où s'installe la réaction CARS et l'état d'immunosuppression.

La tolérance aux endotoxines et les cellules dendritiques

Une activation inappropriée des CD, telle qu'observée suivant la brûlure sévère, peut engendrer une activation des cellules T vers une réponse de type Th2 ou encore une inactivation de ces dernières. Cette reprogrammation des CD observée lors de la phase CARS rappelle le phénomène de tolérance aux endotoxines. Ce phénomène représente le facteur de risque dans l'apparition de septicémies chez les patients gravement brûlés. La tolérance aux LPS est caractérisée par une production réduite de cytokines pro-inflammatoires par les leucocytes devenus tolérants, suite à une première exposition à ce même stimulus (Cavaillon et Adib-Conquy, 2006). Jusqu'à présent, les connaissances portant sur la tolérance aux LPS des CD sont limitées. Bien que la différenciation de CD en présence de GM-CSF/IL-4 (GMDCs) ait été longuement utilisée, il a récemment été démontré que ces dernières s'apparentaient aux CDs Tip (Xu et al., 2007). Tout comme pour les CDs Tip, les GMDCs sont de larges cellules granuleuses ayant un phénotype $CD11c^{+}CMH II^{+}MAC-3^{+}$ produisant de grandes quantités de $TNF-\alpha$ et de l'iNOS suivant l'activation de leurs TLRs. De plus, une stimulation aux LPS n'induit pas d'augmentation de l'expression du TLR4/MD-2 chez les GMDCs (Yanagawa et Onoe, 2007), tel que noté chez les MAC (Nomura et al., 2000). Les études ayant utilisé le facteur de croissance Flt-3L pour la différenciation de CD à partir des précurseurs de la moelle osseuse, ont permis d'élaborer une nouvelle lignée de CD *in vitro* (Maraskovsky et al., 1996). Tel que mentionné, ces CD, communément appelées les FLDCs, ont des propriétés phénotypiques et fonctionnelles s'apparentant aux CD présentes dans la rate (Naik et al., 2005). L'utilisation de FLDCs permet également d'obtenir un nombre important de CD et plus précisément une population hétérogène de CD comprenant les CD $CD24^{high}$ (équivalentes - $CD8\alpha^{+}$) et les CD $CD11b^{high}$ (équivalentes - $CD8\alpha^{-}$) (**Article II/Figure 1**) (Naik, 2008). Nous avons donc utilisé les FLDCs comme modèle d'étude *in vitro* dans le but d'élucider les changements induits lors de la tolérance aux endotoxines. Tout d'abord, nous avons voulu appuyer l'étude de Naik quant aux similarités de la transduction du signal du TLR4 entre les FLDCs et les CD spléniques. En présence de LPS, nous avons noté une hausse de l'expression du TLR4/MD-2, une activation des MAP kinases (p38, JNK et ERK) ainsi qu'une augmentation de la sous-unité p65/RelA du complexe NF- κ B dans le noyau (**Article II/Figure 2 et 3**). Notre étude démontre que l'engagement du TLR4 chez les FLDCs

active les deux grandes voies de signalisation intracellulaire, soit les MAP kinases (p38, SAPK/JNK et ERK1/2) et le facteur de transcription NF- κ B (**Article II/Figure 3**), tel qu'observé chez les CDs de la rate (**Article I/Figure 5**) (An et al., 2002a).

L'initiation de ces deux cascades est essentielle à la régulation de l'IL-12p40 et la maturation des CDs puisqu'elle permet le recrutement d'autres facteurs de transcription (ex. :AP-1, C/EBP, ATF2, etc.) et le remodelage de la chromatine (Murphy et al., 1995; Plevy et al., 1997; Rescigno et al., 1998). L'activation d'AP-1 requiert généralement la phosphorylation de la protéine c-Jun par SAPK/JNK et la transcription du gène *c-fos* (Shaulian et Karin, 2002). En l'occurrence, l'induction de C/EBP requiert l'activation de la p38 MAPK chez les MAC (Poli, 1998). De plus, le remodelage de la chromatine permettant l'accessibilité du promoteur p40 du gène IL-12, est dépendante de l'activation de la p38 MAPK (Saccani, Pantano et Natoli, 2002; Weinmann et al., 2001). Nos résultats démontrent que l'induction des deux voies de signalisation intracellulaire du TLR4 engendre une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation (CD86, CD80 et CD40) et du CMH II chez les FLDCs (**Article II/Figure 4A**). Cette activation intracellulaire enclenche aussi une hausse significative d'IL-12p40 (**Article II/Figure 5A**) et, à moindre niveau, une augmentation d'IL-10 (**Article II/Figure 5B**) chez les FLDCs. Contrairement aux études qui ont observé de hauts niveaux d'IL-10 chez les GMDCs stimulées aux LPS (Taieb et al., 2007; Yanagawa et Onoe, 2007; Dowling, Hamilton et O'Neill, 2008), nous avons démontré que les FLDCs en produisent que très peu. En fait, les concentrations d'IL-10 observées chez les FLDCs stimulées aux LPS sont similaires à ceux obtenues chez les CDs isolées de la rate des souris témoins (**Article II/Figure 5B versus Article I/Figure 4B**). De part ces résultats, les CDs différenciées *in vitro* en présence de Flt-3L présente un bon modèle d'étude de la biologie et des compétences des CDs isolées *in vivo*.

Par la suite, nous avons étudié l'induction de la tolérance aux LPS chez les FLDCs. En pré-traitant les FLDCs avec du LPS (1 μ g/ml), nous avons généré un état de tolérance vis-à-vis une seconde stimulation avec ce même activateur (Cavaillon et

Adib-Conquy, 2006). Nos résultats démontrent que l'inhibition de l'expression du TLR4/MD-2 engendre un état de tolérance aux LPS (**Article II/Figure 2**). Cette diminution de l'expression du TLR4 a également été observée chez les CD_s spléniques de notre modèle murin de brûlure sévère lors de la période CARS (**Article I**). Cette diminution de l'expression du récepteur TLR4 expliquerait en partie l'inhibition de la réponse inflammatoire suivant une stimulation aux LPS et donc, la reprogrammation des CD_s vers un état de tolérance face à une infection secondaire. Le rôle du récepteur TLR4 a grandement été étudié chez les monocytes/MAC isolés de modèles murins de la tolérance aux LPS (Nomura et al., 2000; Li et al., 2009) ou encore chez les patients souffrant de chocs septiques. Il a été démontré que l'expression monocyttaire de TLR2 et de TLR4 était diminuée chez des patients souffrant d'un choc septique (Salomao et al., 2009; Schaaf et al., 2009). Une inhibition persistante de l'expression des TLR trouvée chez ces patients en choc septique témoignerait d'un pronostic péjoratif et serait associée à une haute incidence de mortalité, tel qu'il a été suggéré pour une diminution de l'expression de l'HLA-DR monocyttaire (Salomao et al., 2009; Volk et al., 1996). À noter que l'apparition de la tolérance aux LPS n'est pas due uniquement à une diminution de son récepteur spécifique mais également à une altération de l'activation intracellulaire du TLR4 (Medvedev, Kopydlowski et Vogel, 2000; Medvedev et al., 2001). Chez les FLDCs tolérantes aux LPS, nous avons observé une inhibition de la phosphorylation de la p38 MAPK et de la SAPK/JNK MAPK (**Article II/Figure 3A**). Il a été démontré qu'une inhibition de la forme phosphorylée de la p38 MAPK induit une réduction significative de la production d'IL-12 chez les MAC (Zhao et al., 2005) et les GMDCs (Dowling, Hamilton et O'Neill, 2008). Bien que nous n'ayons pas utilisé des inhibiteurs spécifiques des MAP kinases dans notre modèle d'étude, nous pensons que la réduction d'IL-12p40 produite par les FLDCs tolérantes (**Article II/Figure 6A**) serait en partie causée par la suppression de la p38 MAPK et de la SAPK/JNK MAPK actives. À l'opposé, nous avons noté une hausse de la forme phosphorylée de l'ERK1/2 MAPK suivant une stimulation aux LPS des FLDCs tolérantes (**Article II/Figure 3A**). Ce changement dans le patron d'activation des MAP kinases a également été noté chez les GMDCs devenus tolérants à une seconde stimulation aux LPS (Yanagawa et Onoe, 2007). Puisqu'il a été démontré que la MAP kinase ERK1/2 joue un rôle essentiel dans la production d'IL-10 (Nakahara et al., 2006; Dowling, Hamilton et O'Neill, 2008), ceci pourrait expliquer l'augmentation

significative d'IL-10 produite chez les FLDCs tolérantes (**Article II/Figure 6B**). L'IL-10 est une cytokine qui régule négativement la transcription de certaines cytokines, dont l'INF- γ (Song et al., 1997) et l'IL-12p40 (Zhou, Nazarian et Smale, 2004). L'IL-10 inhibe le recrutement de l'ARN polymérase II et réduit le remodelage du nucléosome au niveau du promoteur du gène p40 chez les MAC stimulés aux LPS (Zhou, Nazarian et Smale, 2004). Ainsi, les hauts niveaux d'IL-10, produits par FLDCs tolérantes aux LPS, pourraient également être impliqués dans l'inhibition de la synthèse d'IL-12p40. Outre l'implication d'ERK1/2, des études utilisant des inhibiteurs de la p38 MAPK ont démontré l'implication de cette protéine dans la transcription et la production d'IL-10 chez les MAC (Ma et al., 2001; Guo, Gerl et Schrader, 2003; Chanteux et al., 2007). L'activation de p38 MAPK et d'ERK1/2 MAPK est impliquée dans le recrutement du facteur de transcription Sp1, un des principaux facteurs de transcription régulant la synthèse d'IL-10 chez les monocytes/MAC (Tone et al., 2000). Ainsi, l'augmentation minime de la phosphorylation de p38 MAPK (**Article II/Figure 3A**) chez les FLDCs tolérantes régulerait, en association avec ERK1/2 MAPK, la production d'IL-10 chez les FLDCs tolérantes.

Nos résultats démontrent une différence au niveau de la phosphorylation des MAP kinases observée suivant une stimulation du TLR4 des CDs isolées du modèle de la brûlure sévère versus la tolérance aux LPS. Bien que le rôle spécifique de chacune des MAP kinases n'ait pas été étudié dans cette étude, certaines hypothèses peuvent être émises. Tout comme pour les CDs spléniques, les niveaux de phosphorylation ont été mesurés dans la population totale de FLDCs. À noter que l'on remarque également une légère augmentation des niveaux de phosphorylation de la p38 MAPK chez les FLDCs tolérantes (**Article II/Figure 3A**). Tout comme pour les CDs isolées de la rate, la hausse de la p38 MAPK phosphorylée pourrait être associée à l'activation d'une sous-population spécifique de FLDCs (CD24^{high} ou CD11b^{high}). Puisque ces deux types cellulaires regroupent diverses populations, il serait nécessaire d'évaluer l'activation des MAP kinases, par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques ou d'oligonucléotides anti-sens dirigés contre les MAP kinases, pour chacune d'elles.

La seconde hypothèse est que la brûlure est un environnement regroupant un vaste réseau de cellules et de pathogènes pouvant interagir avec les CD. L'induction de la tolérance aux endotoxines *in vitro* néglige l'impact des cellules environnantes, des multiples pathogènes, des hormones de stress, ou encore de protéines provenant de nécrose cellulaire sur les compétences des CD. Bien que l'induction de la tolérance aux LPS *in vitro* ne permette pas de reproduire le processus de la brûlure sévère dans sa complexité, elle permet néanmoins de caractériser certains mécanismes. Par la suite, ces derniers pourront être évalués dans un modèle murin *in vivo*. Néanmoins, nos résultats démontrent que tout comme pour la brûlure sévère, l'induction de tolérance aux LPS induit une inhibition de la production d'IL-12p40 des CD. Il a été proposé par Efron et Moldawer (Efron et Moldawer, 2003) qu'une brûlure sévère induirait un changement de la transduction du signal intracellulaire du TLR4 causant l'apparition d'un phénotype tolérogénique des CD (Kalinski et al., 1999).

Adib-Conquy et al. ont observé dès le premier jour suivant un traumatisme sévère, une diminution de l'activation de NF- κ B et de l'expression nucléaire de sa sous-unité p65 transactivatrice chez les PBMCs (cellules mononucléées sanguines) stimulées *ex vivo* par du LPS (Adib-Conquy et al., 2001). Nos résultats démontrent également une diminution de la sous-unité transactivatrice p65/RelA du complexe NF- κ B dans le noyau des FLDCs tolérantes (**Article II/Figure 3B**). La diminution de l'expression nucléaire de NF- κ B peut être la conséquence d'une production de cytokines anti-inflammatoires, tels que l'IL-10 ou TGF- β (Adib-Conquy et al., 2001). Cette suppression de l'activité de NF- κ B aurait également un rôle à jouer dans l'inhibition de la synthèse d'IL-12p40 chez les FLDCs tolérantes. Nos résultats suggèrent encore une fois que la suppression d'IL-12p40, observée chez les FLDCs tolérantes aux LPS ou chez les CD isolées suivant une brûlure sévère, peut être d'origine multifactorielle. Il s'avère donc utile d'avoir un modèle d'étude *in vitro* pour élucider les mécanismes sous-jacents à l'apparition de tolérance aux LPS chez les CD.

Chez les MAC, plusieurs protéines inhibitrices de la cascade intracellulaire du TLR4 ont été identifiées (Cavaillon et Adib-Conquy, 2006)). Certaines sont spécifiques aux MAC, telle qu'IRAK-M (Kobayashi et al., 2002), alors que d'autres (SOCS1 et TOLLIP) ne semblent pas être impliquées dans l'immunomodulation des CDs suivant un choc septique (Adib-Conquy et al., 2006). Tel qu'indiqué précédemment, la brûlure sévère induit une hausse des hormones de stress, dont les glucocorticoïdes (D'Elia et al., 2005). Ces hormones ont la capacité de contrôler l'inflammation en augmentant, entre autre, l'expression de la phosphatase MKP-1 au niveau des MAC (Abraham et al., 2006). MKP-1 a été identifiée comme étant une phosphatase qui déphosphoryle les MAP kinases p38 et SAPK/JNK. Toutefois, la MAP kinase ERK1/2 ne semble pas être sujette à la régulation négative de la phosphatase MKP-1 (Zhao et al., 2006). De part ces faits, nous avons étudié l'implication de la MKP-1 dans l'induction de la tolérance aux LPS des CDs. Nos résultats démontrent qu'en association avec la diminution de la forme phosphorylée de la p38 MAPK et de SAPK/JNK MAPK, il y a une augmentation de l'expression protéinique de MKP-1 (**Article II/Figure 7**). Le rôle de MKP-1 a surtout été étudié chez les MAC. Il a été démontré que la MKP-1 régule la production de TNF- α des MAC (Chen et al., 2002). Notre étude démontre que la tolérance aux LPS des FLDCs induit l'expression de la phosphatase MKP-1, qui est reconnu comme étant un inhibiteur de la forme phosphorylée de la p38 MAPK et de la SAPK/JNK (**Figure 10**). De futures expérimentations seraient nécessaires pour caractériser le rôle de cette phosphatase dans la régulation des MAP kinases et la synthèse d'IL-12p40 versus d'IL-10 chez les FLDCs tolérantes. Un inhibiteur spécifique de MKP-1 permettrait d'évaluer son activité phosphatase dans l'induction de la tolérance. Outre la phosphatase MKP-1, les hauts niveaux d'IL-10 pourraient également être impliqués dans l'inhibition de la voie de signalisation du TLR4. Une étude récente a démontré que l'IL-10 régule négativement la voie de signalisation MyD88-dépendante du TLR chez les CDs tolérantes aux LPS (Chang, Kunkel et Chang, 2009). Cette régulation négative se ferait par l'ubiquitination de certaines protéines activatrices de la voie de signalisation du TLR4, dont IRAK1, IRK4 et TRAF6, initiant leur dégradation par le protéasome. Ainsi, l'utilisation des FLDCs s'avérera utile dans l'identification d'autres régulateurs négatifs (MyD88s, ABIN-3, DUSP1, etc.) de la voie du TLR4 et leur rôle dans la tolérance aux LPS.

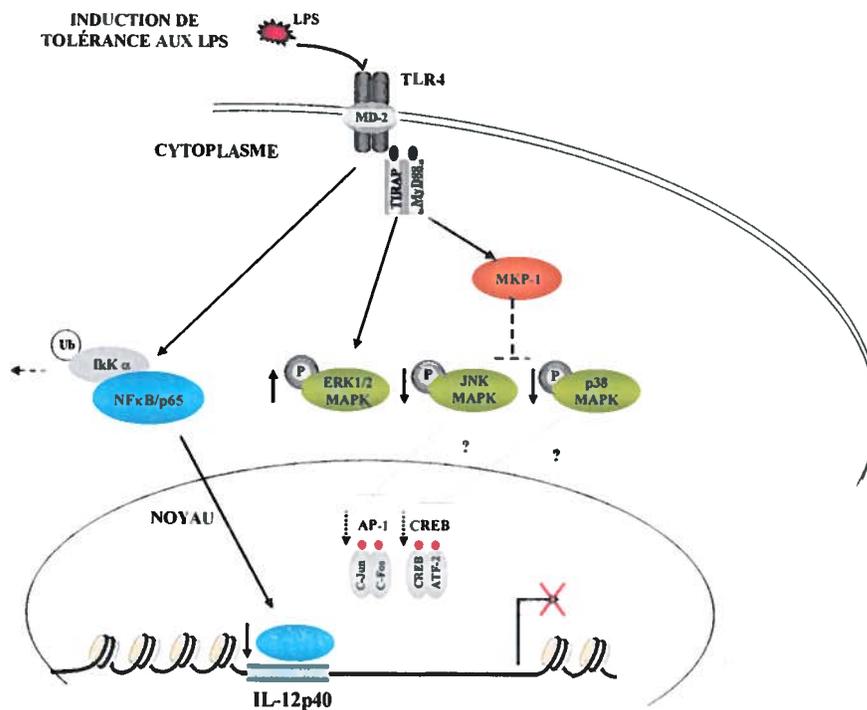


Figure 10 : Mécanismes impliqués dans l'induction de la tolérance aux LPS chez les FLDCs. La tolérance aux LPS induit (→) une hausse de l'expression de la phosphatase MKP-1. Il a également été démontré que la tolérance aux LPS supprime la forme phosphorylée de la p38 MAPK et de la JNK/SAPK MAPK. Il est possible que l'action de la phosphatase MKP-1 soit responsable de l'inhibition (----) de la phosphorylation des MAP kinases. Cette diminution de l'activation de la p38 MAPK et de la SAPK/JNK MAPK pourrait être impliquée dans la diminution d'IL-12p40 sécrétée par les FLDCs tolérantes via une diminution du recrutement de facteurs de transcription (AP-1, CREB) (----) essentiels à la transcription du gène. Toutefois, l'implication de la MKP-1 dans l'inhibition de l'IL-12p40 reste à être démontrée chez les FLDCs. Une diminution de la sous unité p65/RelA dans le noyau des FLDCs pourrait également être impliquée dans la diminution d'IL-12p40 produite suivant une seconde stimulation aux LPS induit (→).

La tolérance aux LPS chez les MAC résulte aussi d'une suppression de la transcription des gènes pro-inflammatoires via une perturbation du remodelage de la chromatine (McCall et Yoza, 2007). Il a été proposé que la tolérance induit une baisse de l'accessibilité des gènes pro-inflammatoires chez les monocytes (Munoz et al., 1991) et les neutrophiles (McCall et al., 1993). Ce phénomène est nommé signature

silencieuse (*silencing signature*) des gènes pro-inflammatoires. Chez l'humain, l'administration intraveineuse d'endotoxines engendre une signature silencieuse de la réponse inflammatoire pour une courte durée (24-48h) (van der Poll et al., 1996). Cependant, suivant une réaction SRIS cette atténuation persiste pour plusieurs jours voir même jusqu'à quelques semaines (McCall et al., 1993). Deux autres réactions sont reliées aux gènes silencieux de la réponse inflammatoire : une augmentation de l'expression des protéines anti-inflammatoires (antagoniste de l'IL-1R, IL-6, l'IL-1R de type 2 et l'IL-10) et une persistance de certaines protéines ayant un potentiel pro-inflammatoire (ex. : HMGB-1 et MIF) (McCall et Yoza, 2007). Les gènes dits silencieux sont assemblés en une structure chromatinienne caractéristique, peu accessible à la machinerie transcriptionnelle. Cette chromatine "fermée" est généralement caractérisée par des modifications covalentes impliquant la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et l'acétylation de résidus clefs des histones. Les enzymes HDACs jouent un rôle important dans le remodelage de la chromatine via la désacétylation des histones. L'équipe d'Aung et al. a démontré qu'une stimulation du TLR4 chez les MAC induit un changement dans l'expression génique de certaines HDACs (Aung et al., 2006). Une stimulation aux LPS réprime transitoirement l'expression génique des HDACs de classe II (*HDAC-4, 5, 6 et 7*) qui, selon Aung et al., permet une transcription maximale des gènes (ex. *Cox-2*). À l'opposé, l'expression d'*HDAC-1* est augmentée chez les MAC stimulés aux LPS. Tel qu'il a été mentionné précédemment, l'apparition de tolérance chez les CD4 joue un rôle important dans l'immunorégulation après un traumatisme sévère. Par ailleurs, il a clairement été défini que l'inhibition d'IL-12 par les CD4 est un facteur clé dans l'origine des événements septiques et l'induction d'une réponse de type Th2 suivant une infection (Wen et al., 2006). Les mécanismes responsables de cette reprogrammation des CD4 sont encore inconnus. Une étude récente a démontré que l'expression génique de l'IL-12 chez les souris septiques, est en partie régulée par des modifications épigénétiques (Wen et al., 2008). Une diminution de la méthylation au niveau du promoteur de l'IL-12p35 et de l'IL-12p40 serait impliquée dans la diminution de l'expression génique de l'IL-12. De part ces études, nous avons donc étudié le rôle des HDACs de la classe I dans la régulation de l'IL-12p40 des FLDCs lorsqu'il y a induction de la tolérance aux LPS. Dans un premier temps, nos résultats montrent une suppression transitoire de l'expression de l'HDAC-1 et 3 suivant une première stimulation aux LPS chez les FLDCs (**Article III/Figure 2**). L'induction de

la tolérance aux LPS n'a pas induit de changement significatif quant à l'expression des HDAC-1, 2 et 3 (Article II/Figure 3A). Cependant, l'activité totale des HDACs est augmentée chez les FLDCs devenues tolérantes à une seconde stimulation aux LPS (Article II/Figure 3B). L'analyse de l'activité spécifique des HDACs a révélé une augmentation de l'HDAC-2 et de l'HDAC-3 suivant l'induction de la tolérance aux LPS (Article III/Figure 3C). Le rôle des HDACs de classe I diffère selon le gène étudié et le niveau d'activation des cellules ciblées. Par exemple, HDAC-1 peut réguler la transcription du gène IL-12p40 via une modification de co-facteurs recrutés (Lu et al., 2005) ou une inhibition de l'accessibilité des sites κ B (Zhong et al., 2002). Ainsi, des essais d'immunoprécipitation de la chromatine seraient nécessaires quant à la caractérisation du rôle spécifique des HDACs sur la régulation de l'IL-12p40 des FLDCs.

Depuis une dizaine d'années, les études humaines d'immunomodulation du choc septique ont consisté à bloquer divers médiateurs pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , *platelet aggregating factor* [PAF], bradykinines, prostaglandines), sans amélioration significative de la mortalité (Abraham, 1999). Il est intéressant de noter que des traitements immuno-stimulants à l'aide d'IFN- γ recombinant (Docke et al., 1997) ou d'anticorps anti-IL-10 (Lyons et al., 1999) ont été associés à des résultats très encourageants, permettant d'espérer des résultats positifs dans les phases tardives, où il y a induction de tolérance, de chocs septiques humains. Il est donc difficile de prédire a priori si un sujet nécessite un blocage de l'inflammation ou au contraire une immuno-stimulation lors de la phase tardive. Il est envisageable dans le futur de développer des stratégies visant à tester *in vitro* au besoin les fonctions leucocytaires et ainsi aider au choix d'un traitement, d'une dose et du temps d'administration et permettre un monitoring de l'effet du traitement immuno-modulateur. Les inhibiteurs des histone-désacétylases représentent une nouvelle classe de médicaments non-invasifs dans le traitement de maladies inflammatoires (Mishra et al., 2003; Nasu et al., 2008; Kim et al., 2007; Choi et al., 2005). Il existe une très grande diversité des iHDACs, qu'ils soient d'origine naturelle ou synthétique. Les iHDACs naturels, comme la TSA, la SAHA ou encore le butyrate de sodium, présentent une activité *in vivo* mais leur développement est limité par leur instabilité et leur faible rétention

(Acharya et al., 2005). De là est née une seconde génération d'iHDACs, tel que le LAQ824, analogues aux acides hydroxamiques et dont le développement est actuellement en phase d'essais cliniques. La plupart des iHDACs hydroxamiques inhibent les HDACs de classes I et II et sont inefficaces sur les enzymes de classe III. Il a été démontré que la TSA et la SAHA inhibent le recrutement de co-facteurs sur le gène de l'IL-12p40 des GMDCs stimulées aux LPS (Bode et al., 2007). Chez les CD8 stimuées via leur TLR4 (LPS), les iHDACs (LAQ824) induit une suppression des molécules de co-stimulation (CD40 et CD80) et d'IL-12p40 (Brogdon et al., 2007). L'inhibition des HDACs de classe I favorise également une réponse de type Th2 des cellules T (IL-13, IL-15) tout en réduisant une réponse de type Th1 (IFN- γ , IL-2) favorisant (Su et al., 2008). De part ces faits, l'activité des HDACs joue un rôle crucial dans la polarisation de la réponse Th1 versus Th2 et dans l'activation des CD8. Nous avons donc traité nos FLDCs avec un inhibiteur d'HDACs (TSA) ou un activateur d'HDACs (théophylline) afin d'élucider le rôle de ces enzymes dans la régulation de l'IL-12 suivant la tolérance aux LPS.

Le traitement des FLDCs avec des concentrations croissantes de TSA a eu pour effet d'inhiber complètement la sécrétion d'IL-12p40 (Article II/Figure 4). Cette suppression d'IL-12p40 a été observée autant chez les FLDCs stimulées pour une première fois avec du LPS que chez les FLDCs tolérantes. Les HDACs sont donc essentielles dans la régulation de la réponse inflammatoire des FLDCs. Bien que l'on ait noté une augmentation de l'activité des HDACs suivant la tolérance aux LPS, nos résultats ne permettent pas de conclure que cette augmentation favorise la suppression de l'IL-12p40. L'inhibition d'IL-12 en présence d'iHDACs s'expliquerait par une suppression du recrutement de co-facteurs, dont RelA et IRF-1, au promoteur du gène suivant une stimulation du TLR4 des DCs (Bode et al., 2007). Si le rôle des HDACs dans la régulation de l'expression des gènes par désacétylation des extrémités des histones est bien établi, leur rôle dans la désacétylation des protéines non-histones est beaucoup moins bien connu mais tout aussi important. Par exemple, la désacétylation de p65 par les HDACs joue un rôle dans les mécanismes qui contrôlent l'activité physiologique du complexe NF- κ B (Mahlknecht et al., 2004; Ozawa et al., 2001; Viatour et al., 2003).

La théophylline, un activateur de HDACs, a surtout été utilisée comme traitement combinatoire avec les corticostéroïdes dans la maladie COPD. L'équipe de Barnes s'intéresse à évaluer la balance HAT/HDAC au cours de l'inflammation des voies respiratoires dans COPD (Ito, Barnes et Adcock, 2000). Cette équipe a émis l'hypothèse qu'une réduction de l'activité HDAC-2 empêcherait les corticostéroïdes à exercer leur activité anti-inflammatoire dans cette maladie. À de faibles concentrations, la théophylline augmente l'activité de l'HDAC-2 permettant un rétablissement de la sensibilité aux corticostéroïdes (Ito, Barnes et Adcock, 2000). Nous avons donc décidé de traiter nos FLDCs avec de la théophylline lors de la seconde stimulation aux LPS et mesurer les concentrations d'IL-12p40 produites. Nos résultats indiquent qu'une augmentation de l'activité des HDACs renverse l'inhibition de la production d'IL-12p40 des FLDCs tolérantes (**Article III/Figure 5A**). Tel que nous avons observé, une diminution d'IL-12p40 lors de la tolérance aux LPS est associée à une baisse de l'activation de la p38 MAPK (**Article III/Figure 5B et Article II/Figure 3A**). Nous avons donc mesuré la forme phosphorylée de la p38 MAPK chez les FLDCs tolérantes suivant une exposition à la théophylline. À 25 μM de théophylline, nous notons une augmentation de la phosphorylation de la p38 MAPK chez les FLDCs tolérantes stimulées aux LPS. L'activité de la théophylline lors de l'induction de la tolérance aux LPS (seconde stimulation) serait donc liée à sa capacité de modifier l'équilibre HAT/HDAC au sein des FLDCs. De fait, il a été démontré que de faibles doses de théophylline sont capables de restaurer l'activité d'HDAC2 par une augmentation de la phosphorylation de l'enzyme HDAC2 qui emprunte la voie des MAPK (p38) chez les cellules épithéliales du poumon humain A549 (Ito et al., 2002). Ce groupe de recherche a identifié un site de phosphorylation chez les HDAC-1, HDAC-2 et HDAC-3 ce qui suggère que la théophylline est impliquée dans la phosphorylation de protéines cibles via un mécanisme encore inconnu. Tel qu'illustré à la **figure 11**, nous croyons qu'une phosphorylation des MAPK (p38) permettrait une activité des HDACs de classe I qui, à leur tour, entraîneraient le recrutement de co-facteurs essentiels à la transcription du gène à l'IL-12p40. Une inhibition de la phosphorylation des MAP kinases lors de l'induction de tolérance aux LPS serait en partie responsable des altérations fonctionnelles des HDACs.

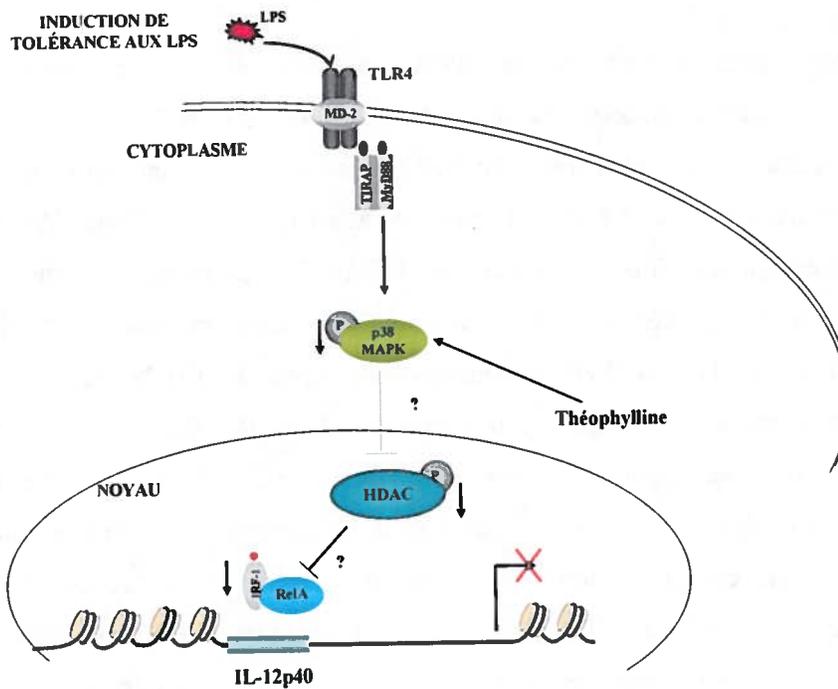


Figure 11 : Modèle d'action des HDACs dans la tolérance aux LPS. L'induction de la tolérance aux LPS est associée à une perturbation de l'activité des HDACs de classe I, causant possiblement une suppression du recrutement de co-facteurs sur le gène de l'IL-12p40. Un rétablissement (→) de l'activité des HDACs par l'utilisation de la théophylline permet de renverser l'inhibition d'IL-12p40 chez les FLDCs tolérantes. La théophylline augmente la phosphorylation de la p38 MAPK. Cette protéine peut être impliquée directement dans la régulation de l'IL-12p40 ou indirectement via une hausse de l'activité des HDACs qui à leur tour permettront le recrutement de co-facteurs sur le promoteur du gène.

Perspectives

Plusieurs expériences peuvent être suggérées afin d'accroître les connaissances sur la biologie des CD8 et leur implication dans l'immunomodulation suivant une brûlure sévère. Tout d'abord, l'isolement des deux sous-populations de CD8, les CD8 α^+ et les CD8 α^- , permettrait d'identifier leur rôle spécifique dans l'immunomodulation suivant une brûlure sévère. Il serait donc possible d'évaluer la voie d'activation du TLR4 des deux sous-populations et leur capacité à synthétiser de l'IL-12p40 versus l'IL-10. Il a été démontré qu'une infection à la *Salmonella* induisait la mort par apoptose des CD8 CD8 α^+ et non celle des CD8 CD8 α^- ou des CD8 CD11c^{int}CD11b^{high}, via la voie d'activation MyD88 dépendante du TLR (Sundquist et Wick, 2008). La mort sélective des CD8 CD8 α^+ permettrait à la bactérie *Salmonella* d'altérer la réponse immunitaire de type Th1 durant l'infection. De part ces faits, l'isolement des sous-populations de CD8 permettrait également d'observer si la brûlure sévère induit la mort cellulaire d'une d'entre-elle. Un co-marquage des CD8 CD8 α^+ et des CD8 CD8 α^- par le 7AAD et l'annexine V permettrait de déterminer, dans un premier temps, si la brûlure induirait la mort cellulaire d'une des sous-populations de CD8. Par la suite, cette coloration permettrait de savoir si une stimulation *ex vivo* du TLR4 (LPS) enclencherait l'apoptose chez une des sous-populations de CD8.

Tel qu'il a été démontré, les FLDCs représentent un modèle efficace dans l'étude de la biologie des CD8. Ainsi, il serait important de caractériser plus spécifiquement la cascade intracellulaire du TLR4 lors du processus inflammatoire ou de l'induction de tolérance aux LPS. L'utilisation d'inhibiteurs des MAP kinases pourrait s'avérer bénéfique quant à la compréhension de leur rôle dans l'activation des CD8. L'équipe de Dowling avait étudié le rôle des différentes MAP kinases chez les GMDCs, CD8 qui malheureusement ne s'apparentent pas à celles présentes dans les organes lymphoïdes (Dowling, Hamilton et O'Neill, 2008). Bien que nous ayons observé l'implication de la phosphatase MKP-1 dans l'induction de la tolérance aux LPS des FLDCs, d'autres molécules pourraient être étudiées. L'étude des membres de la famille des SOCS lors de l'induction de la tolérance pourrait être intéressante, puisque ces dernières sont grandement impliquées dans la régulation des cytokines suivant

l'activation des TLRs. Il a été démontré que SOCS1 et SOCS3 régulent la voie d'activation du TLR4 chez les MAC et les CDs (Baetz et al., 2004).

Comme il a été mentionné ci-haut, l'utilisation d'inhibiteurs et/ou d'activateurs d'HDACs est un bon outil pour caractériser l'impact de ces protéines dans la régulation de la tolérance aux endotoxines. Tout comme il a été fait chez les THP-1 (El Gazzar et al., 2007b) et les GMDCs (Bode et al., 2007), des essais d'immunoprécipitation de la chromatine (ChiP) permettraient d'évaluer les niveaux phosphorylés ou/et acétylés de l'histone H3 sur le gène de l'IL-12 des FLDCs tolérantes. Des résultats préliminaires de notre laboratoire suggèrent que la tolérance aux LPS des FLDCs est la conséquence d'une diminution des niveaux d'acétylation et de phosphorylation de l'histone H3 (Annexe/Figure13). Ces essais ChiP permettraient également de caractériser les interactions entre les facteurs de transcription et les co-facteurs sur le gène de l'IL-12 des FLDCs tolérantes traitées ou non avec la théophylline. De plus, l'incubation des FLDCs avec différents ARN d'interférence pour les HDACs de classe I, permettrait de caractériser le rôle de chacune de ces enzymes.

Finalement, il serait important de caractériser les changements induits par la brûlure au niveau de l'activité HDACs chez les DCs isolées de la rate. Afin de bien suivre les modifications au niveau des DCs, l'étude devrait se faire aux jours 1, 5 et 10 suivant le traumatisme. Un inhibiteur d'HDACs, plus spécifiquement la TSA, pourrait être administré chez le modèle murin de la brûlure sévère afin de vérifier sa capacité à réguler la phase SRIS observée durant la phase précoce. Il a été démontré qu'une injection de 1mg/kg de TSA diminuait de façon significative la réponse inflammatoire chez des souris asthmatiques (Choi et al., 2005). Les différents paramètres étudiés au niveau des CDs tels que la maturation, l'activation des MAPK et du facteur de transcription NF- κ B, la production de cytokines (IL-12 et IL-10) ainsi que leur capacité à activer les cellules T seraient évalués. De part nos résultats, il semblerait que l'administration quotidienne de théophylline chez les modèle murin de la brûlure sévère pourrait présenter des effets bénéfiques sur le rétablissement d'une réponse

inflammatoire adéquate lors de la phase tardive. Ainsi, les expériences décrites précédemment pourraient être faites, mais en utilisant de la théophylline.

Conclusion

Nos résultats ont permis de démontrer que :

- Les compétences des CD8 sont altérées suivant une brûlure sévère, plus spécifiquement celles de la sous-population de CD8 α^+ ;
- Le traumatisme d'une brûlure sévère affecte l'activation de la cascade intracellulaire du TLR4 des CD8 ;
- L'utilisation des FLDCs représente un bon modèle d'étude *in vitro* de la biologie des CD8 présentes dans les organes lymphoïdes *in vivo* ;
- L'induction de la tolérance aux LPS s'associe à une diminution de la phosphorylation de p38 MAPK et de SAPK/JNK MAPK, une baisse de la sous-unité p65/RelA du NF- κ B tout en augmentant l'expression de ERK1/2 chez les FLDCs ;
- La brûlure sévère et l'induction de tolérance aux LPS induisent une diminution de la synthèse d'IL-12p40 et une augmentation d'IL-10 chez les CD8 ;
- Une perturbation de l'activité HDACs semble être impliquée dans la diminution d'IL-12p40 observée chez les FLDCs tolérantes.

En conclusion, nous avons démontré que les compétences des CD8 sont affectées suivant le traumatisme d'une brûlure sévère. Bien qu'il y ait observation d'une activation des MAP kinases suivant une stimulation *ex vivo* du TLR4 des CD8, il y a inhibition de la production d'IL-12. Ainsi, les CD8 participent à la polarisation de la réponse Th1 vers une réponse Th2 de part leur sécrétion d'IL-10 et l'inhibition des fonctions des CD8 α^+ . Cette reprogrammation des CD8 vers un état tolérogénique, favorise l'apparition de l'état d'immunosuppression et la survenue de septicémies lors de phase tardive (CARS). À partir des FLDCs, nous avons proposé certains mécanismes responsables de cet état de tolérance aux endotoxines. Une augmentation de la MKP-1, une molécule inhibitrice la voie d'activation des MAP kinases semble être impliquée. De plus, une activité altérée des HDACs pourrait être à l'origine des modifications épigénétiques au niveau de l'IL-12 et l'induction d'un état tolérogénique des CD8. Bien que les modulateurs d'HDACs présentent des propriétés anticancéreuses, une stratégie actuelle consiste à utiliser ceux-ci pour réguler certaines pathologies liées à une mauvaise régulation de la réponse

inflammatoire. L'utilisation de tels modulateurs pourrait faire partie des nouveaux moyens thérapeutiques envisagés pour lutter contre les perturbations immunologiques néfastes suivant une brûlure sévère.

RÉFÉRENCES

ABRAHAM, E. 1996. Alterations in transcriptional regulation of proinflammatory and immunoregulatory cytokine expression by hemorrhage, injury, and critical illness. New Horiz, vol. 4, no. 2, p. 184-93.

ABRAHAM, E. 1999. Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis. Intensive Care Med, vol. 25, no. 6, p. 556-66.

ABRAHAM, S. M. et al. 2006. Antiinflammatory effects of dexamethasone are partly dependent on induction of dual specificity phosphatase 1. J Exp Med, vol. 203, no. 8, p. 1883-9.

ACHARYA, M. R., A. Sparreboom, J. Venitz et W. D. Figg. 2005. Rational development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents: a review. Mol Pharmacol, vol. 68, no. 4, p. 917-32.

ADCOCK, I. M. 2007. HDAC inhibitors as anti-inflammatory agents. Br J Pharmacol, vol. 150, no. 7, p. 829-31.

ADCOCK, I. M. et G. Caramori. 2001. Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids. Immunol Cell Biol, vol. 79, no. 4, p. 376-84.

ADIB-CONQUY, M. et al. 2006. Up-regulation of MyD88s and SIGIRR, molecules inhibiting Toll-like receptor signaling, in monocytes from septic patients. Crit Care Med, vol. 34, no. 9, p. 2377-85.

ADIB-CONQUY, M., K. Asehnoune, P. Moine et J. M. Cavillon. 2001. Long-term-impaired expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha in peripheral blood mononuclear cells of trauma patients. J Leukoc Biol, vol. 70, no. 1, p. 30-8.

AGNELLO, D. et al. 2003. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. J Clin Immunol, vol. 23, no. 3, p. 147-61.

AHMED, S. el-D, A. S. el-Shahat et S. O. Saad. 1999. Assessment of certain neutrophil receptors, opsonophagocytosis and soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) following thermal injury. Burns, vol. 25, no. 5, p. 395-401.

AKIRA, S. et K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol, vol. 4, no. 7, p. 499-511.

ALBERT, M. L. et al. 1998. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. J Exp Med, vol. 188, no. 7, p. 1359-68.

ALBRECHT, I. et al. 2004. Toll-like receptors differentially induce nucleosome remodelling at the IL-12p40 promoter. EMBO Rep, vol. 5, no. 2, p. 172-7.

ALEXANDER, J. W. et J. A. Moncrief. 1966. Alterations of the immune response following severe thermal injury. Arch Surg, vol. 93, no. 1, p. 75-83.

ALEXANDER, M., T. Daniel, I. H. Chaudry et M. G. Schwacha. 2004. MAP kinases differentially regulate the expression of macrophage hyperactivity after thermal injury. J Cell Physiol, vol. 201, no. 1, p. 35-44.

- AMI, K. et al. 2002. IFN-gamma production from liver mononuclear cells of mice in burn injury as well as in postburn bacterial infection models and the therapeutic effect of IL-18. J Immunol, vol. 169, no. 8, p. 4437-42.
- AN, H. et al. 2002a. Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. Immunology, vol. 106, no. 1, p. 38-45.
- AN, H. et al. 2002b. Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. Immunology, vol. 106, no. 1, p. 38-45.
- ARBOUR, N. C. et al. 2000. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. Nat Genet, vol. 25, no. 2, p. 187-91.
- ARDAVIN, C., L. Wu, C. L. Li et K. Shortman. 1993. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. Nature, vol. 362, no. 6422, p. 761-3.
- ARRIGHI, J. F., M. Rebsamen, F. Rousset, V. Kindler et C. Hauser. 2001. A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. J Immunol, vol. 166, no. 6, p. 3837-45.
- ARTURSON, G., M. Hamberg et C. E. Jonsson. 1973. Prostaglandins in human burn blister fluid. Acta Physiol Scand, vol. 87, no. 2, p. 270-6.
- ARTURSON, G., C. F. Hogman, S. G. Johansson et J. Killander. 1969. Changes in immunoglobulin levels in severely burned patients. Lancet, vol. 1, no. 7594, p. 546-8.
- ASKEW, D., R. S. Chu, A. M. Krieg et C. V. Harding. 2000. CpG DNA induces maturation of dendritic cells with distinct effects on nascent and recycling MHC-II antigen-processing mechanisms. J Immunol, vol. 165, no. 12, p. 6889-95.
- AUNG, H. T. et al. 2006. LPS regulates proinflammatory gene expression in macrophages by altering histone deacetylase expression. FASEB J, vol. 20, no. 9, p. 1315-27.
- AYALA, A., C. S. Chung, G. Y. Song et 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. et al. 1991. Differential alterations in plasma IL-6 and TNF levels after trauma and hemorrhage. Am J Physiol, vol. 260, no. 1 Pt 2, p. R167-71.
- BACHMANN, M. F. et al. 1997. Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. Immunity, vol. 7, no. 4, p. 549-57.
- BAETZ, A., M. Frey, K. Heeg et A. H. Dalpke. 2004. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins indirectly regulate toll-like receptor signaling in innate immune cells. J Biol Chem, vol. 279, no. 52, p. 54708-15.
- BANCHEREAU, J. et al. 2000. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol, vol. 18, no. 767-811.

- BANCHEREAU, J. et R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. Nature, vol. 392, no. 6673, p. 245-52.
- BANWELL, P. E., A. M. Watts, J. V. Murphy et A. H. Roberts. 1998. Immunosuppression following thermal injury. Br J Plast Surg, 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.
- BARNES, P. J. 2002. The role of inflammation and anti-inflammatory medication in asthma. Respir Med, vol. 96 Suppl A, no. S9-15.
- BARNES, P. J. 2003. Theophylline: new perspectives for an old drug. Am J Respir Crit Care Med, vol. 167, no. 6, p. 813-8.
- BARNES, P. J., I. M. Adcock et K. Ito. 2005. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. Eur Respir J, vol. 25, no. 3, p. 552-63.
- BARNES, P. J., K. Ito et I. M. Adcock. 2004. Corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease: inactivation of histone deacetylase. Lancet, vol. 363, no. 9410, p. 731-3.
- BAUMANN, H. et J. Gauldie. 1994. The acute phase response. Immunol Today, vol. 15, no. 2, p. 74-80.
- BECKER, S., M. K. Warren et S. Haskill. 1987. Colony-stimulating factor-induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum-free cultures. J Immunol, vol. 139, no. 11, p. 3703-9.
- BEG, A. A. 2002. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. Trends Immunol, vol. 23, no. 11, p. 509-12.
- BENDER, B. S. et al. 1988. Depressed natural killer cell function in thermally injured adults: successful in vivo and in vitro immunomodulation and the role of endotoxin. Clin Exp Immunol, vol. 71, no. 1, p. 120-5 .
- BERNIER, J., N. Jobin, A. Emptoz-Bonneton, M. M. Pugeat et D. R. Garrel. 1998. Decreased corticosteroid-binding globulin in burn patients: relationship with interleukin-6 and fat in nutritional support. Crit Care Med, vol. 26, no. 3, p. 452-60.
- BEUTLER, B. 2000. Endotoxin, toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity. Curr Opin Microbiol, vol. 3, no. 1, p. 23-8.
- BEVAN, M. J. 1976. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. J Exp Med, vol. 143, no. 5, p. 1283-8.
- BLANCHARD, F. et C. Chipoy. 2005. Histone deacetylase inhibitors: new drugs for the treatment of inflammatory diseases? Drug Discov Today, vol. 10, no. 3, p. 197-204.
- BODE, K. A. et al. 2007. Histone deacetylase inhibitors decrease Toll-like receptor-mediated activation of proinflammatory gene expression by impairing transcription factor recruitment. Immunology, vol. 122, no. 4, p. 596-606.

- BOISMENU, R., L. Feng, Y. Y. Xia, J. C. Chang et W. L. Havran. 1996. Chemokine expression by intraepithelial gamma delta T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia. J Immunol, vol. 157, no. 3, p. 985-92.
- BONE, R. C. 1994. Sepsis and SIRS. Nephrol Dial Transplant, vol. 9 Suppl 4, no. 99-103.
- BOONSTRA, A. et al. 2006. Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. J Immunol, vol. 177, no. 11, p. 7551-8.
- BOSMA, B. M. et al. 2008. Dexamethasone transforms lipopolysaccharide-stimulated human blood myeloid dendritic cells into myeloid dendritic cells that prime interleukin-10 production in T cells. Immunology, vol. 125, no. 1, p. 91-100.
- BOURGEOIS, C., B. Rocha et C. Tanchot. 2002. A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. Science, vol. 297, no. 5589, p. 2060-3.
- BRASEL, K., T. De Smedt, J. L. Smith et C. R. Maliszewski. 2000. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. Blood, vol. 96, no. 9, p. 3029-39.
- BRAWAND, P. et al. 2002. Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs. J Immunol, vol. 169, no. 12, p. 6711-9.
- BRINT, E. K. et al. 2004. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. Nat Immunol, vol. 5, no. 4, p. 373-9.
- BROGDON, J. L. et al. 2007. Histone deacetylase activities are required for innate immune cell control of Th1 but not Th2 effector cell function. Blood, vol. 109, no. 3, p. 1123-30.
- BROWN, M. F. et al. 1990. The role of leukocytes in mediating mucosal injury of intestinal ischemia/reperfusion. J Pediatr Surg, vol. 25, no. 2, p. 214-6; discussion 216-7.
- BURNS, K. et al. 2003. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. J Exp Med, vol. 197, no. 2, p. 263-8.
- CALVANO, J. E. et al. 2006. Response to systemic endotoxemia among humans bearing polymorphisms of the Toll-like receptor 4 (hTLR4). Clin Immunol, vol. 121, no. 2, p. 186-90.
- CAO, W., C. Bao, E. Padalko et C. J. Lowenstein. 2008. Acetylation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 inhibits Toll-like receptor signaling. J Exp Med, vol. 205, no. 6, p. 1491-503.
- CARDING, S. R. et P. J. Egan. 2002. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. Nat Rev Immunol, vol. 2, no. 5, p. 336-45.
- CARTER, E. A. et al. 1994. Nitric oxide production is intensely and persistently increased in tissue by thermal injury. Biochem J, vol. 304 (Pt 1), no. 201-4.
- CAVAILLON, J. M. et M. Adib-Conquy. 2006. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. Crit Care, vol. 10, no. 5, p. 233.

- CEBON, J., J. E. Layton, D. Maher et G. Morstyn. 1994. Endogenous haemopoietic growth factors in neutropenia and infection. Br J Haematol, vol. 86, no. 2, p. 265-74.
- CELLA, M. et al. 1999. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. J Exp Med, vol. 189, no. 5, p. 821-9.
- CETINKALE, O., D. Konukoglu, O. Senel, G. D. Kemerli et S. Yazar. 1999. Modulating the functions of neutrophils and lipid peroxidation by FK506 in a rat model of thermal injury. Burns, vol. 25, no. 2, p. 105-12.
- CHANG, J., S. L. Kunkel et C. H. Chang. 2009. Negative regulation of MyD88-dependent signaling by IL-10 in dendritic cells. Proc Natl Acad Sci U S A, vol.
- CHANTEUX, H., A. C. Guisset, C. Pilette et Y. Sibille. 2007. LPS induces IL-10 production by human alveolar macrophages via MAPKs- and Sp1-dependent mechanisms. Respir Res, vol. 8, no. 71.
- CHARBONNIER, A. S. et al. 1999. Macrophage inflammatory protein 3 α is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells. J Exp Med, vol. 190, no. 12, p. 1755-68.
- CHARO, I. F., C. Yuen, H. D. Perez et I. M. Goldstein. 1986. Chemotactic peptides modulate adherence of human polymorphonuclear leukocytes to monolayers of cultured endothelial cells. J Immunol, vol. 136, no. 9, p. 3412-9.
- CHEERS, C. et al. 1988. Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separate determinations of macrophage-, granulocyte-, granulocyte-macrophage-, and multi-CSFs. Infect Immun, vol. 56, no. 1, p. 247-51.
- CHEN, A. I. et al. 1999. Ox40-ligand has a critical costimulatory role in dendritic cell:T cell interactions. Immunity, vol. 11, no. 6, p. 689-98.
- CHEN, P. et al. 2002. Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. J Immunol, vol. 169, no. 11, p. 6408-16.
- CHEUNG, P., C. D. Allis et P. Sassone-Corsi. 2000. Signaling to chromatin through histone modifications. Cell, vol. 103, no. 2, p. 263-71.
- CHOI, J. H. et al. 2005. Trichostatin A attenuates airway inflammation in mouse asthma model. Clin Exp Allergy, vol. 35, no. 1, p. 89-96.
- CHOUDHRY, M. A., N. Fazal, M. Goto, R. L. Gamelli et M. M. Sayeed. 2002. Gut-associated lymphoid T cell suppression enhances bacterial translocation in alcohol and burn injury. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, vol. 282, no. 6, p. G937-47.
- CHOUDHRY, M. A. et al. 2001. PGE2 suppresses intestinal T cell function in thermal injury: a cause of enhanced bacterial translocation. Shock, vol. 16, no. 3, p. 183-8.
- CHOUDHRY, M. A., S. Uddin et M. M. Sayeed. 1998. Prostaglandin E2 modulation of p59fyn tyrosine kinase in T lymphocytes during sepsis. J Immunol, vol. 160, no. 2, p. 929-35.
- COLONNA, M., G. Trinchieri et Y. J. Liu. 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. Nat Immunol, vol. 5, no. 12, p. 1219-26.

- CONTI, L. et al. 2005. Reciprocal activating interaction between dendritic cells and pamidronate-stimulated gammadelta T cells: role of CD86 and inflammatory cytokines. J Immunol, vol. 174, no. 1, p. 252-60.
- COSIO, B. G. et al. 2004. Histone acetylase and deacetylase activity in alveolar macrophages and blood monocytes in asthma. Am J Respir Crit Care Med, vol. 170, no. 2, p. 141-7.
- COX, R. A. et al. 2001. Enhanced pulmonary expression of endothelin-1 in an ovine model of smoke inhalation injury. J Burn Care Rehabil, vol. 22, no. 6, p. 375-83.
- CREUSOT, R. J., N. A. Mitchison et N. M. Terazzini. 2002. The immunological synapse. Mol Immunol, vol. 38, no. 12-13, p. 997-1002.
- CUEVAS, P. et al. 1974. Role of endotoxemia of intestinal origin in early death from large burns. Surg Gynecol Obstet, vol. 138, no. 5, p. 725-30.
- CUNHA, F. Q., S. Moncada et F. Y. Liew. 1992. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. Biochem Biophys Res Commun, vol. 182, no. 3, p. 1155-9.
- D'ARPA, N. et al. 2009. Circulating dendritic cells following burn. Burns, vol. 35, no. 4, p. 513-8.
- D'ELIA, M., J. Patenaude, C. Hamelin, D. R. Garrel et J. Bernier. 2005. Corticosterone binding globulin regulation and thymus changes after thermal injury in mice. Am J Physiol Endocrinol Metab, vol. 288, no. 5, p. E852-60.
- DAHIYA, P. 2009. Burns as a model of SIRS. Front Biosci, vol. 14, no. 4962-7.
- DALPKE, A. H., S. Opper, S. Zimmermann et K. Heeg. 2001. Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs. J Immunol, vol. 166, no. 12, p. 7082-9.
- DANIEL, T. et al. 2007. Regulation of the postburn wound inflammatory response by gammadelta T-cells. Shock, vol. 28, no. 3, p. 278-83.
- DAVIE, J. R. 2003. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. J Nutr, vol. 133, no. 7 Suppl, p. 2485S-2493S.
- DE, A. K. et al. 1997. Only a subset of trauma patients with depressed mitogen responses have true T cell dysfunctions. Clin Immunol Immunopathol, vol. 82, no. 1, p. 73-82.
- DE BANDT, J. P. et al. 1994a. Cytokine response to burn injury: relationship with protein metabolism. J Trauma, vol. 36, no. 5, p. 624-8.
- DE BANDT, J. P. et al. 1994b. Cytokine response to burn injury: relationship with protein metabolism. J Trauma, vol. 36, no. 5, p. 624-8.
- DE BANDT, J. P. et al. 1998. A randomized controlled trial of the influence of the mode of enteral ornithine alpha-ketoglutarate administration in burn patients. J Nutr, vol. 128, no. 3, p. 563-9.
- DE BOER, J. P. et al. 1992. Interplay of complement and cytokines in the pathogenesis of

septic shock. Immunopharmacology, vol. 24, no. 2, p. 135-48.

DEARMAN, R. J., M. Cumberbatch, G. Maxwell, D. A. Basketter et I. Kimber. 2008a. Toll-like receptor ligand activation of murine bone marrow-derived dendritic cells. Immunology, vol.

DEARMAN, R. J., M. Cumberbatch, G. Maxwell, D. A. Basketter et I. Kimber. 2008b. Toll-like receptor ligand activation of murine bone marrow-derived dendritic cells. Immunology, vol.

DEITCH, E. A. et R. Berg. 1987. Bacterial translocation from the gut: a mechanism of infection. J Burn Care Rehabil, vol. 8, no. 6, p. 475-82.

DEITCH, E. A., J. Winterton et R. Berg. 1986. Thermal injury promotes bacterial translocation from the gastrointestinal tract in mice with impaired T-cell-mediated immunity. Arch Surg, vol. 121, no. 1, p. 97-101.

DEITCH, E. A., D. Z. Xu et L. Qi. 1990. Different lymphocyte compartments respond differently to mitogenic stimulation after thermal injury. Ann Surg, vol. 211, no. 1, p. 72-7.

DELLA CHIESA, M., C. Romagnani, A. Thiel, L. Moretta et A. Moretta. 2006. Multidirectional interactions are bridging human NK cells with plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells during innate immune responses. Blood, vol. 108, no. 12, p. 3851-8.

DEMLING, R. H. et C. LaLonde. 1990. Early postburn lipid peroxidation: effect of ibuprofen and allopurinol. Surgery, vol. 107, no. 1, p. 85-93.

DEMLING, R. H. et P. Seigne. 2000. Metabolic management of patients with severe burns. World J Surg, vol. 24, no. 6, p. 673-80.

DETOURNAY, O., N. Mazouz, M. Goldman et M. Toungouz. 2005. IL-6 produced by type I IFN DC controls IFN-gamma production by regulating the suppressive effect of CD4+ CD25+ regulatory T cells. Hum Immunol, vol. 66, no. 5, p. 460-8.

DIEU, M. C. et al. 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. J Exp Med, vol. 188, no. 2, p. 373-86.

DIEU-NOSJEAN, M. C. et al. 2000. Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. J Exp Med, vol. 192, no. 5, p. 705-18.

DINARELLO, C. A. et al. 1986. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. J Exp Med, vol. 163, no. 6, p. 1433-50.

DING, L., P. S. Linsley, L. Y. Huang, R. N. Germain et E. M. Shevach. 1993. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. J Immunol, vol. 151, no. 3, p. 1224-34.

DING, L. et E. M. Shevach. 1992. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. J Immunol, vol. 148, no. 10, p. 3133-9.

DITSCHKOWSKI, M. et al. 1999. HLA-DR expression and soluble HLA-DR levels in septic

patients after trauma. Ann Surg, vol. 229, no. 2, p. 246-54.

DOBROVOLSKAIA, M. A. et al. 2003. Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components. J Immunol, vol. 170, no. 1, p. 508-19.

DOCKE, W. D. et al. 1997. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. Nat Med, vol. 3, no. 6, p. 678-81.

DODGE, I. L., M. W. Carr, M. Cernadas et M. B. Brenner. 2003. IL-6 production by pulmonary dendritic cells impedes Th1 immune responses. J Immunol, vol. 170, no. 9, p. 4457-64.

DOKMANOVIC, M. et P. A. Marks. 2005. Prospects: histone deacetylase inhibitors. J Cell Biochem, vol. 96, no. 2, p. 293-304.

DOWLING, D., C. M. Hamilton et S. M. O'Neill. 2008. A comparative analysis of cytokine responses, cell surface marker expression and MAPKs in DCs matured with LPS compared with a panel of TLR ligands. Cytokine, vol.

DUAN, X., D. Yarmush, A. Leeder, M. L. Yarmush et R. N. Mitchell. 2008. Burn-induced immunosuppression: attenuated T cell signaling independent of IFN-gamma- and nitric oxide-mediated pathways. J Leukoc Biol, vol. 83, no. 2, p. 305-13.

DUTNALL, R. N. et L. Pillus. 2001. Deciphering NAD-dependent deacetylases. Cell, vol. 105, no. 2, p. 161-4.

EFRON, P. et L. L. Moldawer. 2003. Sepsis and the dendritic cell. Shock, vol. 20, no. 5, p. 386-401.

EFRON, P. A. et al. 2004. Characterization of the systemic loss of dendritic cells in murine lymph nodes during polymicrobial sepsis. J Immunol, vol. 173, no. 5, p. 3035-43.

EL GAZZAR, M., B. K. Yoza, J. Y. Hu, S. L. Cousart et C. E. McCall. 2007a. Epigenetic silencing of tumor necrosis factor alpha during endotoxin tolerance. J Biol Chem, vol. 282, no. 37, p. 26857-64.

EL GAZZAR, M., B. K. Yoza, J. Y. Hu, S. L. Cousart et C. E. McCall. 2007b. Epigenetic silencing of tumor necrosis factor alpha during endotoxin tolerance. J Biol Chem, vol. 282, no. 37, p. 26857-64.

ENOH, V. T. et al. 2007. Mice depleted of alphabeta but not gammadelta T cells are resistant to mortality caused by cecal ligation and puncture. Shock, vol. 27, no. 5, p. 507-19.

ERTEL, W. et al. 1995. Release of anti-inflammatory mediators after mechanical trauma correlates with severity of injury and clinical outcome. J Trauma, vol. 39, no. 5, p. 879-85; discussion 885-7.

FALLARINO, F. et al. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. Nat Immunol, vol. 4, no. 12, p. 1206-12.

FAN, H. et J. A. Cook. 2004. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. J Endotoxin Res, vol. 10, no. 2, p. 71-84.

- FARRAR, J. D., H. Asnagli et K. M. Murphy. 2002. T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. J Clin Invest, vol. 109, no. 4, p. 431-5.
- FAUNCE, D. E., R. L. Gamelli, M. A. Choudhry et E. J. Kovacs. 2003. A role for CD1d-restricted NKT cells in injury-associated T cell suppression. J Leukoc Biol, vol. 73, no. 6, p. 747-55.
- FAZAL, N. et W. M. Al-Ghoul. 2007. Thermal injury-plus-sepsis contributes to a substantial deletion of intestinal mesenteric lymph node CD4 T cell via apoptosis. Int J Biol Sci, vol. 3, no. 6, p. 393-401.
- FAZAL, N., M. A. Choudhry et M. M. Sayeed. 2005. Inhibition of T cell MAPKs (Erk 1/2, p38) with thermal injury is related to down-regulation of Ca²⁺ signaling. Biochim Biophys Acta, vol. 1741, no. 1-2, p. 113-9.
- FERNANDEZ, N. C. et al. 1999. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. Nat Med, vol. 5, no. 4, p. 405-11.
- FINNERTY, C. C., R. Przkora, D. N. Herndon et M. G. Jeschke. 2009. Cytokine expression profile over time in burned mice. Cytokine, vol. 45, no. 1, p. 20-5.
- FITTING, C., S. Dhawan et J. M. Cavillon. 2004. Compartmentalization of tolerance to endotoxin. J Infect Dis, vol. 189, no. 7, p. 1295-303.
- FITZGERALD-BOCARSLY, P., J. Dai et S. Singh. 2008. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. Cytokine Growth Factor Rev, vol. 19, no. 1, p. 3-19.
- FITZGERALD, K. A. et al. 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. Nature, vol. 413, no. 6851, p. 78-83.
- FOGG, D. K. et al. 2006. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. Science, vol. 311, no. 5757, p. 83-7.
- FONTANILLA, C. V. et al. 2000. Anti-interleukin-6 antibody treatment restores cell-mediated immune function in mice with acute ethanol exposure before burn trauma. Alcohol Clin Exp Res, vol. 24, no. 9, p. 1392-9.
- FRIEDL, H. P., G. O. Till, O. Trentz et P. A. Ward. 1989. Roles of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin. Am J Pathol, vol. 135, no. 1, p. 203-17.
- FRIEDMAN, G. et al. 1997. Blood interleukin 10 levels parallel the severity of septic shock. J Crit Care, vol. 12, no. 4, p. 183-7.
- FUJIMI, S. et al. 2009. Murine dendritic cell antigen-presenting cell function is not altered by burn injury. J Leukoc Biol, vol. 85, no. 5, p. 862-70.
- FUKUZUKA, K. et al. 2000. Glucocorticoid and Fas ligand induced mucosal lymphocyte apoptosis after burn injury. J Trauma, vol. 49, no. 4, p. 710-6.
- GAN, H. T., P. J. Pasricha et J. D. Chen. 2007. Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway ameliorates delayed intestinal transit in burned rats. Am J Surg, vol. 193, no. 4, p. 530-7.

- GARREL, D. et al. 2003. Decreased mortality and infectious morbidity in adult burn patients given enteral glutamine supplements: a prospective, controlled, randomized clinical trial. Crit Care Med, vol. 31, no. 10, p. 2444-9.
- GAUTIER, E. L. et al. 2008. Enhanced dendritic cell survival attenuates lipopolysaccharide-induced immunosuppression and increases resistance to lethal endotoxic shock. J Immunol, vol. 180, no. 10, p. 6941-6.
- GAUTREAUX, M. D., E. A. Deitch et R. D. Berg. 1994. T lymphocytes in host defense against bacterial translocation from the gastrointestinal tract. Infect Immun, vol. 62, no. 7, p. 2874-84.
- GEISSMANN, F., S. Jung et D. R. Littman. 2003a. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity, vol. 19, no. 1, p. 71-82.
- GEISSMANN, F., S. Jung et D. R. Littman. 2003b. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity, vol. 19, no. 1, p. 71-82.
- GHAZNAWIE, M., J. M. Papadimitriou et P. J. Heenan. 1999. The repopulation of murine Langerhans cells after depletion by mild heat injury. Br J Dermatol, vol. 141, no. 2, p. 206-10.
- GILL, R. G. 1993. T-cell-T-cell collaboration in allograft responses. Curr Opin Immunol, vol. 5, no. 5, p. 782-7.
- GILLIET, M. et al. 2002. The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. J Exp Med, vol. 195, no. 7, p. 953-8.
- GINHOUX, F. et al. 2007. Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. J Exp Med, vol. 204, no. 13, p. 3133-46.
- GINHOUX, F. et al. 2006. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. Nat Immunol, vol. 7, no. 3, p. 265-73.
- GOEBEL, A. et al. 2000. Injury induces deficient interleukin-12 production, but interleukin-12 therapy after injury restores resistance to infection. Ann Surg, vol. 231, no. 2, p. 253-61.
- GOTHELF, Y. et al. 1988. T6 positive cells in the peripheral blood of burn patients: are they Langerhans cells precursors? J Invest Dermatol, vol. 90, no. 2, p. 142-8.
- GRABHER, A. et al. 1994. Subcellular location of enzymes involved in core histone acetylation. Biochemistry (Mosc), vol. 33, no. 49, p. 14887-95.
- GREGORETTI, I. V., Y. M. Lee et H. V. Goodson. 2004. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. J Mol Biol, vol. 338, no. 1, p. 17-31.
- GROUARD, G. et al. 1997. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. J Exp Med, vol. 185, no. 6, p. 1101-11.
- GUERMONPREZ, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery et S. Amigorena. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu Rev Immunol, vol. 20, no. 621-67.

GUO, X., R. E. Gerl et J. W. Schrader. 2003. Defining the involvement of p38alpha MAPK in the production of anti- and proinflammatory cytokines using an SB 203580-resistant form of the kinase. J Biol Chem, vol. 278, no. 25, p. 22237-42.

GUO, Z. et al. 2003. Burn injury promotes antigen-driven Th2-type responses in vivo. J Immunol, vol. 171, no. 8, p. 3983-90.

HAAS, W., P. Pereira et S. Tonegawa. 1993. Gamma/delta cells. Annu Rev Immunol, vol. 11, no. 637-85.

HAENEY, M. R. 1998. The role of the complement cascade in sepsis. J Antimicrob Chemother, vol. 41 Suppl A, no. 41-6.

HAHN, E. L. et R. L. Gamelli. 2000. Prostaglandin E2 synthesis and metabolism in burn injury and trauma. J Trauma, vol. 49, no. 6, p. 1147-54.

HALILI, M. A., M. R. Andrews, M. J. Sweet et D. P. Fairlie. 2009. Histone deacetylase inhibitors in inflammatory disease. Curr Top Med Chem, vol. 9, no. 3, p. 309-19.

HAMON, M. A. et P. Cossart. 2008. Histone modifications and chromatin remodeling during bacterial infections. Cell Host Microbe, vol. 4, no. 2, p. 100-9.

HANADA, T. et al. 2005. Induction of hyper Th1 cell-type immune responses by dendritic cells lacking the suppressor of cytokine signaling-1 gene. J Immunol, vol. 174, no. 7, p. 4325-32.

HARMS, B. A. et al. 1981. Prostaglandin release and altered microvascular integrity after burn injury. J Surg Res, vol. 31, no. 4, p. 274-80.

HARRINGTON, L. E. et al. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol, vol. 6, no. 11, p. 1123-32.

HART, D. W. et al. 2000. Persistence of muscle catabolism after severe burn. Surgery, vol. 128, no. 2, p. 312-9.

HARTER, L., L. Mica, R. Stocker, O. Trentz et M. Keel. 2004. Increased expression of toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. Shock, vol. 22, no. 5, p. 403-9.

HAZIOT, A., E. Ferrero, X. Y. Lin, C. L. Stewart et S. M. Goyert. 1995. CD14-deficient mice are exquisitely insensitive to the effects of LPS. Prog Clin Biol Res, vol. 392, no. 349-51.

HE, Y., W. Zhang, R. Zhang, H. Zhang et W. Min. 2006. SOCS1 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of ASK1-JNK inflammatory signaling by mediating ASK1 degradation. J Biol Chem, vol. 281, no. 9, p. 5559-66.

HENRI, S. et al. 2001. The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. J Immunol, vol. 167, no. 2, p. 741-8.

HIKINO, H. et al. 2000. GM-CSF-independent development of dendritic cells from bone marrow cells in the GM-CSF-receptor-deficient mouse. Transplant Proc, vol. 32, no. 7, p. 2458-9.

HIRAMATSU, M., R. S. Hotchkiss, I. E. Karl et 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.

HORGAN, A. F. et al. 1994. Altered gene transcription after burn injury results in depressed T-lymphocyte activation. Ann Surg, vol. 220, no. 3, p. 342-51; discussion 351-2.

HORNG, T., G. M. Barton et R. Medzhitov. 2001. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. Nat Immunol, vol. 2, no. 9, p. 835-41.

HOTCHKISS, R. S. et al. 2002. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. J Immunol, vol. 168, no. 5, p. 2493-500.

HOWITZ, K. T. et al. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. Nature, vol. 425, no. 6954, p. 191-6.

HUBER, L. C. et al. 2007. Histone deacetylase/acetylase activity in total synovial tissue derived from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. Arthritis Rheum, vol. 56, no. 4, p. 1087-93.

HUGO, P., J. W. Kappler, D. I. Godfrey et P. C. Marrack. 1992. A cell line that can induce thymocyte positive selection. Nature, vol. 360, no. 6405, p. 679-82.

INABA, K. et al. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. J Exp Med, vol. 176, no. 6, p. 1693-702.

INABA, K. et R. M. Steinman. 1984. Resting and sensitized T lymphocytes exhibit distinct stimulatory (antigen-presenting cell) requirements for growth and lymphokine release. J Exp Med, vol. 160, no. 6, p. 1717-35.

ITO, K., P. J. Barnes et I. M. Adcock. 2000. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. Mol Cell Biol, vol. 20, no. 18, p. 6891-903.

ITO, K. et al. 2002. Expression and activity of histone deacetylases in human asthmatic airways. Am J Respir Crit Care Med, vol. 166, no. 3, p. 392-6.

ITO, K., T. Hanazawa, K. Tomita, P. J. Barnes et I. M. Adcock. 2004. Oxidative stress reduces histone deacetylase 2 activity and enhances IL-8 gene expression: role of tyrosine nitration. Biochem Biophys Res Commun, vol. 315, no. 1, p. 240-5.

ITO, K. et al. 2005. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. N Engl J Med, vol. 352, no. 19, p. 1967-76.

ITO, K., E. Jazrawi, B. Cosio, P. J. Barnes et I. M. Adcock. 2001a. p65-activated histone acetyltransferase activity is repressed by glucocorticoids: mifepristone fails to recruit HDAC2 to the p65-HAT complex. J Biol Chem, vol. 276, no. 32, p. 30208-15.

ITO, K. et al. 2001b. Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. FASEB J, vol. 15, no. 6, p. 1110-2.

ITO, K. et al. 2002. A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone

deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 99, no. 13, p. 8921-6.

ITO, K. et al. 2006a. Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression. J Exp Med, vol. 203, no. 1, p. 7-13.

ITO, T., H. Kanzler, O. Duramad, W. Cao et Y. J. Liu. 2006b. Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid dendritic cells. Blood, vol. 107, no. 6, p. 2423-31.

IWAMI, K. I. et al. 2000. Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. J Immunol, vol. 165, no. 12, p. 6682-6.

JANSSENS, S. et R. Beyaert. 2003. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. Mol Cell, vol. 11, no. 2, p. 293-302.

JANSSENS, S., K. Burns, J. Tschopp et R. Beyaert. 2002. Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. Curr Biol, vol. 12, no. 6, p. 467-71.

JEEVANANDAM, M., L. Ramias, R. F. Shamos et W. R. Schiller. 1992. Decreased growth hormone levels in the catabolic phase of severe injury. Surgery, vol. 111, no. 5, p. 495-502.

JEGO, G. et al. 2003a. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. Immunity, vol. 19, no. 2, p. 225-34.

JEGO, G. et al. 2003b. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. Immunity, vol. 19, no. 2, p. 225-34.

JIMENEZ, M. F. et al. 1997. Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome. Arch Surg, vol. 132, no. 12, p. 1263-9; discussion 1269-70.

JOBIN, N., D. R. Garrel et J. Bernier. 2000. Increased burn-induced immunosuppression in lipopolysaccharide-resistant mice. Cell Immunol, vol. 200, no. 2, p. 65-75.

JOBIN, N., D. R. Garrel, J. Champoux et J. Bernier. 2000a. Improved immune functions with administration of a low-fat diet in a burn animal model. Cell Immunol, vol. 206, no. 2, p. 71-84.

JOBIN, N., D. R. Garrel, J. Champoux et J. Bernier. 2000b. Improved immune functions with administration of a low-fat diet in a burn animal model. Cell Immunol, vol. 206, no. 2, p. 71-84.

KAIKO, G. E., J. C. Horvat, K. W. Beagley et P. M. Hansbro. 2008. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? Immunology, vol. 123, no. 3, p. 326-38.

KAISHO, T. et al. 2002. Endotoxin can induce MyD88-deficient dendritic cells to support T(h)2 cell differentiation. Int Immunol, vol. 14, no. 7, p. 695-700.

KAISHO, T., O. Takeuchi, T. Kawai, K. Hoshino et S. Akira. 2001. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. J Immunol, vol. 166, no. 9, p. 5688-94.

- KALINSKI, P., C. M. Hilkens, E. A. Wierenga et M. L. Kapsenberg. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. Immunol Today, vol. 20, no. 12, p. 561-7.
- KAMIMURA, M. et al. 2005. Interleukin-10 suppresses tissue factor expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages via inhibition of Egr-1 and a serum response element/MEK-ERK1/2 pathway. Circ Res, vol. 97, no. 4, p. 305-13.
- KARABEYOGLU, M. et al. 2008. The effect of ethyl pyruvate on oxidative stress in intestine and bacterial translocation after thermal injury. J Surg Res, vol. 144, no. 1, p. 59-63.
- KARP, C. L. et al. 1998. Potent suppression of IL-12 production from monocytes and dendritic cells during endotoxin tolerance. Eur J Immunol, vol. 28, no. 10, p. 3128-36.
- KASTELEIN, R. A., C. A. Hunter et D. J. Cua. 2007. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. Annu Rev Immunol, vol. 25, no. 221-42.
- KATARANOVSKI, M. et al. 2000. Increased activity of lymph node cells in experimental thermal injury: changes in accessory cells in injured area-draining lymph nodes. Burns, vol. 26, no. 6, p. 525-34.
- KATO, Y. et al. 2007. Synergistic in vivo antitumor effect of the histone deacetylase inhibitor MS-275 in combination with interleukin 2 in a murine model of renal cell carcinoma. Clin Cancer Res, vol. 13, no. 15 Pt 1, p. 4538-46.
- KAVANAGH, E. G. et al. 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. et al. 1999. Interleukin 10 is not essential for survival or for modulating T-cell function after injury. Surgery, vol. 126, no. 2, p. 456-62.
- KAWAI, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda et S. Akira. 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. Immunity, vol. 11, no. 1, p. 115-22.
- KAWAI, T. et al. 2001. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. J Immunol, vol. 167, no. 10, p. 5887-94.
- KAWASAKI, T. et al. 2008a. Trauma-hemorrhage inhibits splenic dendritic cell proinflammatory cytokine production via a mitogen-activated protein kinase process. Am J Physiol Cell Physiol, vol. 294, no. 3, p. C754-64.
- KAWASAKI, T. et al. 2008b. Trauma-hemorrhage inhibits splenic dendritic cell proinflammatory cytokine production via a mitogen-activated protein kinase process. Am J Physiol Cell Physiol, vol. 294, no. 3, p. C754-64.
- KAWASAKI, T. et al. 2006. Trauma-hemorrhage induces depressed splenic dendritic cell functions in mice. J Immunol, vol. 177, no. 7, p. 4514-20.
- KELL, M. R., E. G. Kavanaugh, A. Goebel, C. C. Soberg et 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.

- KELLY, J. L., C. B. O'Suilleabhain, C. C. Soberg, J. A. Mannick et J. A. Lederer. 1999. Severe injury triggers antigen-specific T-helper cell dysfunction. Shock, vol. 12, no. 1, p. 39-45.
- KIKUCHI, K., Y. Yanagawa, K. Iwabuchi et K. Onoe. 2003. Differential role of mitogen-activated protein kinases in CD40-mediated IL-12 production by immature and mature dendritic cells. Immunol Lett, vol. 89, no. 2-3, p. 149-54.
- KIM, H. J. et al. 2007. Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. J Pharmacol Exp Ther, vol. 321, no. 3, p. 892-901.
- KINJYO, I. et al. 2002. SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. Immunity, vol. 17, no. 5, p. 583-91.
- KINJYO, I. et al. 2006. Loss of SOCS3 in T helper cells resulted in reduced immune responses and hyperproduction of interleukin 10 and transforming growth factor-beta 1. J Exp Med, vol. 203, no. 4, p. 1021-31.
- KINOSHITA, M. et al. 2006. Restoration of natural IgM production from liver B cells by exogenous IL-18 improves the survival of burn-injured mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. J Immunol, vol. 177, no. 7, p. 4627-35.
- KLIMPEL, G. R., D. H. Herndon et M. D. Stein. 1988. Peripheral blood lymphocytes from thermal injury patients are defective in their ability to generate lymphokine-activated killer (LAK) cell activity. J Clin Immunol, vol. 8, no. 1, p. 14-22.
- KLIMPEL, G. R. et al. 1986. Defective NK cell activity following thermal injury. Clin Exp Immunol, vol. 66, no. 2, p. 384-92.
- KOBAYASHI, K. et al. 2002. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. Cell, vol. 110, no. 2, p. 191-202.
- KOPF, M. et al. 1999. OX40-deficient mice are defective in Th cell proliferation but are competent in generating B cell and CTL Responses after virus infection. Immunity, vol. 11, no. 6, p. 699-708.
- KROPSHOFER, H., G. J. Hammerling et A. B. Vogt . 1999. The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules. Immunol Rev, vol. 172, no. 267-78.
- KRUEGER, G. G., R. A. Daynes et M. Emam. 1983. Biology of Langerhans cells: selective migration of Langerhans cells into allogeneic and xenogeneic grafts on nude mice. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 80, no. 6, p. 1650-4.
- KRUG, A. et al. 2004. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. Immunity, vol. 21, no. 1, p. 107-19.
- KUO, M. H. et C. D. Allis. 1998. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. Bioessays, vol. 20, no. 8, p. 615-26.
- KUPPER, T. S., D. R. Green, S. K. Durum et 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.

LAFFON, M., J. F. Pittet, K. Modelska, M. A. Matthay et D. M. Young. 1999. Interleukin-8 mediates injury from smoke inhalation to both the lung endothelial and the alveolar epithelial barriers in rabbits. Am J Respir Crit Care Med, vol. 160, no. 5 Pt 1, p. 1443-9.

LANGENKAMP, A., M. Messi, A. Lanzavecchia et F. Sallusto. 2000a. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. Nat Immunol, vol. 1, no. 4, p. 311-6.

LANGENKAMP, A., M. Messi, A. Lanzavecchia et F. Sallusto. 2000b. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. Nat Immunol, vol. 1, no. 4, p. 311-6.

LANGRISH, C. L. et al. 2004. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. Immunol Rev, vol. 202, no. 96-105.

LAUDANSKI, K. et D. Wyczechowska. 2005. Monocyte-related immunopathologies in trauma patients. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), vol. 53, no. 4, p. 321-8.

LAVELLE, E. C. et al. 2003. Cholera toxin promotes the induction of regulatory T cells specific for bystander antigens by modulating dendritic cell activation. J Immunol, vol. 171, no. 5, p. 2384-92.

LAWRENCE, M. H., H. F. de Riesthal et S. E. Calvano. 1996. Changes in memory and naive CD4+ lymphocytes in lymph nodes and spleen after thermal injury. J Burn Care Rehabil, vol. 17, no. 1, p. 1-6.

LEBOUDER, E. et al. 2003. Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. J Immunol, vol. 171, no. 12, p. 6680-9.

LEMAITRE, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart et J. A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. Cell, vol. 86, no. 6, p. 973-83.

LEONI, F. et al. 2002. The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 99, no. 5, p. 2995-3000.

LI, Y. et al. 2009. Differential gene expression of interleukin-1 receptor associated kinase-1 and interleukin-1 receptor associated kinase-M in peripheral blood mononuclear cells of young and aged rats following preconditioning with endotoxin. Shock, vol. 31, no. 1, p. 55-63.

LIN, H. S. et al. 2007. Anti-rheumatic activities of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in vivo in collagen-induced arthritis in rodents. Br J Pharmacol, vol. 150, no. 7, p. 862-72.

LINDMARK, E., T. Tenno, J. Chen et A. Siegbahn . 1998. IL-10 inhibits LPS-induced human monocyte tissue factor expression in whole blood. Br J Haematol, vol. 102, no. 2, p. 597-604.

LIPSCOMB, M. F. et B. J. Masten. 2002. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. Physiol Rev, vol. 82, no. 1, p. 97-130.

LORD, K. A., B. Hoffman-Liebermann et D. A. Liebermann. 1990. Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. Oncogene, vol. 5, no. 7, p. 1095-7.

LORENZ, E., J. P. Mira, K. L. Frees et D. A. Schwartz. 2002. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. Arch Intern Med, vol. 162, no. 9, p. 1028-32.

LOWES, M. A. et al. 2005. Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 102, no. 52, p. 19057-62.

LU, J. et al. 2005. Interleukin-12 p40 promoter activity is regulated by the reversible acetylation mediated by HDAC1 and p300. Cytokine, vol. 31, no. 1, p. 46-51.

LYONS, A., A. Goebel, J. A. Mannick et J. A. Lederer. 1999. Protective effects of early interleukin 10 antagonism on injury-induced immune dysfunction. Arch Surg, vol. 134, no. 12, p. 1317-23; discussion 1324 .

LYONS, A., J. L. Kelly, M. L. Rodrick, J. A. Mannick et J. A. Lederer. 1997a. Major injury induces increased production of interleukin-10 by cells of the immune system with a negative impact on resistance to infection. Ann Surg, vol. 226, no. 4, p. 450-8; discussion 458-60.

LYONS, A., J. L. Kelly, M. L. Rodrick, J. A. Mannick et J. A. Lederer. 1997b. Major injury induces increased production of interleukin-10 by cells of the immune system with a negative impact on resistance to infection. Ann Surg, vol. 226, no. 4, p. 450-8; discussion 458-60.

MA, W. et al. 2001. The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. J Biol Chem, vol. 276, no. 17, p. 13664-74.

MACCONMARA, M. P. et al. 2006. Increased CD4+ CD25+ T regulatory cell activity in trauma patients depresses protective Th1 immunity. Ann Surg, vol. 244, no. 4, p. 514-23.

MAEKAWA, T., H. Kajihara, K. Okabayashi, M. Otani et 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.

MAHLKNECHT, U., J. Will, A. Varin, D. Hoelzer et G. Herbein. 2004. Histone deacetylase 3, a class I histone deacetylase, suppresses MAPK11-mediated activating transcription factor-2 activation and represses TNF gene expression. J Immunol, vol. 173, no. 6, p. 3979-90.

MALDONADO-LOPEZ, R. et al. 1999a. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. J Exp Med, vol. 189, no. 3, p. 587-92.

MALDONADO-LOPEZ, R. et al. 1999b. Role of CD8alpha+ and CD8alpha- dendritic cells in the induction of primary immune responses in vivo. J Leukoc Biol, vol. 66, no. 2, p. 242-6.

MALDONADO-LOPEZ, R., C. Maliszewski, J. Urbain et M. Moser. 2001. Cytokines regulate the capacity of CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo. J Immunol, vol. 167, no. 8, p. 4345-50.

MALDONADO-LOPEZ, R. et M. Moser. 2001. Dendritic cell subsets and the regulation of

Th1/Th2 responses. Semin Immunol, vol. 13, no. 5, p. 275-82.

MANNICK, J. A., M. L. Rodrick et J. A. Lederer . 2001. The immunologic response to injury. J Am Coll Surg, vol. 193, no. 3, p. 237-44.

MANZ, M. G. et al. 2001a. Dendritic cell development from common myeloid progenitors. Ann N Y Acad Sci, vol. 938, no. 167-73; discussion 173-4.

MANZ, M. G., D. Traver, T. Miyamoto, I. L. Weissman et K. Akashi. 2001b. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. Blood, vol. 97, no. 11, p. 3333-41.

MARASKOVSKY, E. et al. 1996. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. J Exp Med, vol. 184, no. 5, p. 1953-62.

MARKS, P. et al. 2001. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. Nat Rev Cancer, vol. 1, no. 3, p. 194-202.

MARKS, P. A., V. M. Richon et R. A. Rifkind. 2000. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. J Natl Cancer Inst, vol. 92, no. 15, p. 1210-6.

MAROTTA, P., L. Sautebin et M. Di Rosa. 1992. Modulation of the induction of nitric oxide synthase by eicosanoids in the murine macrophage cell line J774. Br J Pharmacol, vol. 107, no. 3, p. 640-1.

MARTIN, P. et al. 2000. Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8alpha(-) and CD8alpha(+) dendritic cells are generated from CD4(low) lymphoid-committed precursors. Blood, vol. 96, no. 7, p. 2511-9.

MARTINEZ DEL HOYO, G., P. Martin, C. F. Arias, A. R. Marin et C. Ardavin. 2002. CD8alpha+ dendritic cells originate from the CD8alpha- dendritic cell subset by a maturation process involving CD8alpha, DEC-205, and CD24 up-regulation. Blood, vol. 99, no. 3, p. 999-1004.

MARWICK, J. A., K. Ito, I. M. Adcock et P. A. Kirkham. 2007. Oxidative stress and steroid resistance in asthma and COPD: pharmacological manipulation of HDAC-2 as a therapeutic strategy. Expert Opin Ther Targets, vol. 11, no. 6, p. 745-55.

MASON, A. D. Jr, A. T. McManus et B. A. Pruitt Jr. 1986. Association of burn mortality and bacteremia. A 25-year review. Arch Surg, vol. 121, no. 9, p. 1027-31.

MATSUSHIMA, A. et al. 2004. Early activation of gammadelta T lymphocytes in patients with severe systemic inflammatory response syndrome. Shock, vol. 22, no. 1, p. 11-5.

MATZINGER, P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. Science, vol. 296, no. 5566, p. 301-5.

MAUNG, A. A. et al. 2005. Enhanced TLR4 reactivity following injury is mediated by increased p38 activation. J Leukoc Biol, vol. 78, no. 2, p. 565-73.

MCADAM, A. J. et al. 2001. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. Nature, vol. 409, no. 6816, p. 102-5.

MCCALL, C. E., L. M. Grosso-Wilmoth, K. LaRue, R. N. Guzman et S. L. Cousart. 1993. Tolerance to endotoxin-induced expression of the interleukin-1 beta gene in blood neutrophils of humans with the sepsis syndrome. J Clin Invest, vol. 91, no. 3, p. 853-61.

MCCALL, C. E. et B. K. Yoza. 2007. Gene silencing in severe systemic inflammation. Am J Respir Crit Care Med, vol. 175, no. 8, p. 763-7.

MCCORD, J. M. 1985. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N Engl J Med, vol. 312, no. 3, p. 159-63.

MCGUIRK, P., C. McCann et K. H. Mills. 2002. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. J Exp Med, vol. 195, no. 2, p. 221-31.

MCIRVINE, A. J., J. B. O'Mahony, I. Saporoschetz et J. A. Mannick. 1982. Depressed immune response in burn patients: use of monoclonal antibodies and functional assays to define the role of suppressor cells. Ann Surg, vol. 196, no. 3, p. 297-304.

MCKENNA, H. J. et al. 2000. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. Blood, vol. 95, no. 11, p. 3489-97.

MCKENZIE, B. S., R. A. Kastelein et D. J. Cua. 2006. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. Trends Immunol, vol. 27, no. 1, p. 17-23.

MEDVEDEV, A. E. et al. 2001. Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 or 4. J Immunol, vol. 167, no. 4, p. 2257-67.

MEDVEDEV, A. E., K. M. Kopydlowski et S. N. Vogel. 2000. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. J Immunol, vol. 164, no. 11, p. 5564-74.

MEDZHITOV, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol, vol. 1, no. 2, p. 135-45.

MEGJUGORAC, N. J., H. A. Young, S. B. Amrute, S. L. Olshalsky et P. Fitzgerald-Bocarsly. 2004. Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells. J Leukoc Biol, vol. 75, no. 3, p. 504-14.

MENDEZ, M. V. et al. 1993. Lymphokine activated killer cells enhance IL-2 prevention of sepsis-related death in a murine model of thermal injury. J Surg Res, vol. 54, no. 6, p. 565-70.

MERRER, J. 2005. [Epidemiology of catheter-related infections in intensive care unit]. Ann Fr Anesth Reanim, vol. 24, no. 3, p. 278-81.

MESCHER, M. F. et al. 2006. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. Immunol Rev, vol. 211, no. 81-92.

MISHRA, N., C. M. Reilly, D. R. Brown, P. Ruiz et G. S. Gilkeson. 2003. Histone deacetylase inhibitors modulate renal disease in the MRL-lpr/lpr mouse. J Clin Invest, vol. 111, no. 4, p. 539-52.

- MIYAKE, K. 2004. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. Trends Microbiol, vol. 12, no. 4, p. 186-92.
- MOORE, F. D. Jr, C. Davis, M. Rodrick, J. A. Mannick et D. T. Fearon. 1986. Neutrophil activation in thermal injury as assessed by increased expression of complement receptors. N Engl J Med, vol. 314, no. 15, p. 948-53.
- MOU, H. B., M. F. Lin, H. Cen, J. Yu et X. J. Meng. 2004. TGF-beta1 treated murine dendritic cells are maturation resistant and down-regulate Toll-like receptor 4 expression. J Zhejiang Univ Sci, vol. 5, no. 10, p. 1239-44.
- MUNOZ, C. et al. 1991. Dissociation between plasma and monocyte-associated cytokines during sepsis. Eur J Immunol, vol. 21, no. 9, p. 2177-84.
- MUNZ, C. et al. 2005. Mature myeloid dendritic cell subsets have distinct roles for activation and viability of circulating human natural killer cells. Blood, vol. 105, no. 1, p. 266-73.
- MURPHY, T. J., N. Ni Choileain, Y. Zang, J. A. Mannick et J. A. Lederer. 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells control innate immune reactivity after injury. J Immunol, vol. 174, no. 5, p. 2957-63.
- MURPHY, T. J., H. M. Paterson, J. A. Mannick et J. A. Lederer. 2004. Injury, sepsis, and the regulation of Toll-like receptor responses. J Leukoc Biol, vol. 75, no. 3, p. 400-7.
- MURPHY, T. L., M. G. Cleveland, P. Kulesza, J. Magram et K. M. Murphy. 1995. Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site. Mol Cell Biol, vol. 15, no. 10, p. 5258-67.
- MUSIKACHAROEN, T., Y. Yoshikai et T. Matsuguchi. 2003. Histone acetylation and activation of cAMP-response element-binding protein regulate transcriptional activation of MKP-M in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. J Biol Chem, vol. 278, no. 11, p. 9167-75.
- MUTHU, K. et al. 2008. Perturbed bone marrow monocyte development following burn injury and sepsis promote hyporesponsive monocytes. J Burn Care Res, vol. 29, no. 1, p. 12-21.
- NAIK, S., D. Vremec, L. Wu, M. O'Keeffe et K. Shortman. 2003. CD8alpha+ mouse spleen dendritic cells do not originate from the CD8alpha- dendritic cell subset. Blood, vol. 102, no. 2, p. 601-4.
- NAIK, S. H. 2008. Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. Immunol Cell Biol, vol. 86, no. 5, p. 439-52.
- NAIK, S. H. et al. 2006. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. Nat Immunol, vol. 7, no. 6, p. 663-71.
- NAIK, S. H. et al. 2005. Cutting edge: generation of splenic CD8+ and CD8- dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. J Immunol, vol. 174, no. 11, p. 6592-7.
- NAKAE, S. et al. 2003. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist.

Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 100, no. 10, p. 5986-90.

NAKAHARA, T., Y. Moroi, H. Uchi et M. Furue. 2006. Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. J Dermatol Sci, vol. 42, no. 1, p. 1-11.

NAKAHARA, T. et al. 2004. Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. Int Immunol, vol. 16, no. 12, p. 1701-9.

NASU, Y. et al. 2008. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses synovial inflammation and subsequent cartilage destruction in a collagen antibody-induced arthritis mouse model. Osteoarthritis Cartilage, vol. 16, no. 6, p. 723-32.

NEUENHAHN, M. et D. H. Busch. 2007. Unique functions of splenic CD8alpha+ dendritic cells during infection with intracellular pathogens. Immunol Lett, vol. 114, no. 2, p. 66-72.

NIEMAN, G. F., W. R. Clark Jr, A. Paskanik et D. Feldbaum. 1995. Segmental pulmonary vascular resistance following wood smoke inhalation. Crit Care Med, vol. 23, no. 7, p. 1264-71.

NIEUWENHUIS, E. E. et al. 2002. CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung. Nat Med, vol. 8, no. 6, p. 588-93.

NIRO, H. et al. 1998. MAP kinase pathways as a route for regulatory mechanisms of IL-10 and IL-4 which inhibit COX-2 expression in human monocytes. Biochem Biophys Res Commun, vol. 250, no. 2, p. 200-5.

NISHIMURA, H. et al. 1995. The role of gamma delta T cells in priming macrophages to produce tumor necrosis factor-alpha. Eur J Immunol, vol. 25, no. 5, p. 1465-8.

NISHIMURA, T., H. Yamamoto, S. deSerres et A. A. Meyer. 1999. Transforming growth factor-beta impairs postburn immunoglobulin production by limiting B-cell proliferation, but not cellular synthesis. J Trauma, vol. 46, no. 5, p. 881-5.

NOEL, G. et al. 2007. Postburn monocytes are the major producers of TNF-alpha in the heterogeneous splenic macrophage population. Shock, vol. 27, no. 3, p. 312-9.

NOMURA, F. et al. 2000. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. J Immunol, vol. 164, no. 7, p. 3476-9.

O'MAHONY, J. B., J. J. Wood, M. L. Rodrick et J. A. Mannick. 1985. Changes in T lymphocyte subsets following injury. Assessment by flow cytometry and relationship to sepsis. Ann Surg, vol. 202, no. 5, p. 580-6 .

O'RIORDAIN, D. S. et al. 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. B., S. Kim, M. R. Rodrick, J. A. Mannick et 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. et al. 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, vol. 222, no. 4, p. 482-90; discussion 490-2.
- O'SULLIVAN, S. T. et T. P. O'Connor. 1997. Immunosuppression following thermal injury: the pathogenesis of immunodysfunction. Br J Plast Surg, vol. 50, no. 8, p. 615-23.
- OHSHIMA, Y. et al. 1997. Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. J Immunol, vol. 159, no. 8, p. 3838-48.
- OHSHIMA, Y. et al. 1998. OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4(+) T cells into high IL-4-producing effectors. Blood, vol. 92, no. 9, p. 3338-45.
- ONO, I. et al. 1993. Effects of a platelet activating factor antagonist on oedema formation following burns. Burns, vol. 19, no. 3, p. 202-7.
- ORGAN, B. C. et al. 1989. Changes in lymphocyte number and phenotype in seven lymphoid compartments after thermal injury. Ann Surg, vol. 210, no. 1, p. 78-89.
- OUAZ, F., J. Arron, Y. Zheng, Y. Choi et A. A. Beg. 2002. Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits. Immunity, vol. 16, no. 2, p. 257-70.
- OZAWA, Y. et al. 2001. Histone deacetylase 3 associates with and represses the transcription factor GATA-2. Blood, vol. 98, no. 7, p. 2116-23.
- PARMENT, K. et al. 2007. Long-term immunosuppression in burned patients assessed by in vitro neutrophil oxidative burst (Phagoburst). Burns, vol. 33, no. 7, p. 865-71.
- PARSEY, M. V., D. Kaneko, R. Shenkar et E. Abraham. 1999. Neutrophil apoptosis in the lung after hemorrhage or endotoxemia: apoptosis and migration are independent of IL-1 beta. Clin Immunol, vol. 91, no. 2, p. 219-25.
- PATENAUDE, J., M. D'Elia, C. Hamelin, D. Garrel et J. Bernier. 2005. Burn injury induces a change in T cell homeostasis affecting preferentially CD4+ T cells. J Leukoc Biol, vol. 77, no. 2, p. 141-50.
- PATERSON, H. M. et al. 2003. Injury primes the innate immune system for enhanced Toll-like receptor reactivity. J Immunol, vol. 171, no. 3, p. 1473-83.
- PENE, F. et al. 2009. TLR2 and TLR4 contribute to sepsis-induced depletion of spleen dendritic cells. Infect Immun, vol.
- PLEVY, S. E., J. H. Gemberling, S. Hsu, A. J. Dorner et S. T. Smale. 1997. Multiple control elements mediate activation of the murine and human interleukin 12 p40 promoters: evidence of functional synergy between C/EBP and Rel proteins. Mol Cell Biol, vol. 17, no. 8, p. 4572-88.
- POECK, H. et al. 2004. Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. Blood, vol. 103, no. 8, p. 3058-64.
- POLI, V. 1998. The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. J Biol Chem, vol. 273, no. 45, p. 29279-82.

- POLTORAK, A. et al. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science, vol. 282, no. 5396, p. 2085-8.
- PREISER, J. C. et al. 1996. Nitric oxide production is increased in patients after burn injury. J Trauma, vol. 40, no. 3, p. 368-71.
- PRILLIMAN, K. R. et al. 2002. Cutting edge: a crucial role for B7-CD28 in transmitting T help from APC to CTL. J Immunol, vol. 169, no. 8, p. 4094-7.
- PUIG-KROGER, A. et al. 2001. Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. Blood, vol. 98, no. 7, p. 2175-82.
- QIAN, C. et al. 2006. TLR agonists promote ERK-mediated preferential IL-10 production of regulatory dendritic cells (diffDCs), leading to NK-cell activation. Blood, vol. 108, no. 7, p. 2307-15.
- QIAN, D. Z. et al. 2007. Antitumor activity of the histone deacetylase inhibitor MS-275 in prostate cancer models. Prostate, vol. 67, no. 11, p. 1182-93.
- RAHMAN, I., J. Marwick et P. Kirkham. 2004. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kappaB and pro-inflammatory gene expression. Biochem Pharmacol, vol. 68, no. 6, p. 1255-67.
- RANDOLPH, G. J., K. Inaba, D. F. Robbani, R. M. Steinman et W. A. Muller. 1999. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. Immunity, vol. 11, no. 6, p. 753-61.
- RAVINDRANATH, T. et al. 2001. Effects of burn with and without Escherichia coli infection in rats on intestinal vs. splenic T-cell responses. Crit Care Med, vol. 29, no. 12, p. 2245-50.
- RE, F. et J. L. Strominger. 2001. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. J Biol Chem, vol. 276, no. 40, p. 37692-9.
- REIS, e. Sousa C et al. 1997. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. J Exp Med, vol. 186, no. 11, p. 1819-29.
- REIS, e. Sousa C et al. 1999. Paralysis of dendritic cell IL-12 production by microbial products prevents infection-induced immunopathology. Immunity, vol. 11, no. 5, p. 637-47.
- RENZ, H., J. H. Gong, A. Schmidt, M. Nain et D. Gernsma. 1988. Release of tumor necrosis factor-alpha from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides. J Immunol, vol. 141, no. 7, p. 2388-93.
- RESCIGNO, M., M. Martino, C. L. Sutherland, M. R. Gold et P. Ricciardi-Castagnoli. 1998. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. J Exp Med, vol. 188, no. 11, p. 2175-80.
- RINCON, M., J. Anguita, T. Nakamura, E. Fikrig et R. A. Flavell. 1997. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. J Exp Med, vol. 185, no. 3, p. 461-9.
- RODRICK, M. L. et al. 1986. Defective IL-2 production in patients with severe burns and

sepsis. Lymphokine Res, vol. 5 Suppl 1, no. S75-80.

SACCANI, S., S. Pantano et G. Natoli. 2002. p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment. Nat Immunol, vol. 3, no. 1, p. 69-75.

SAEMANN, M. D. et al. 2000. Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. FASEB J, vol. 14, no. 15, p. 2380-2.

SAEZ, J. C., P. H. Ward, B. Gunther et E. Vivaldi. 1984. Superoxide radical involvement in the pathogenesis of burn shock. Circ Shock, vol. 12, no. 4, p. 229-39.

SALOJIN, K. V. et al. 2006. Essential role of MAPK phosphatase-1 in the negative control of innate immune responses. J Immunol, vol. 176, no. 3, p. 1899-907.

SALOMAO, R. et al. 2009. Toll-like receptor pathway signaling is differently regulated in neutrophils and peripheral mononuclear cells of patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. Crit Care Med, vol. 37, no. 1, p. 132-9.

SALOMAO, R. et al. 2008. TLR signaling pathway in patients with sepsis. Shock, vol. 30 Suppl 1, no. 73-7.

SANCHEZ, R. 2002. [Initial shock from burns. Physiopathology: therapeutic principles]. Pathol Biol (Paris), vol. 50, no. 2, p. 82-92.

SANTANGELO, S., R. L. Gamelli et R. Shankar. 2001. Myeloid commitment shifts toward monocytopenia after thermal injury and sepsis. Ann Surg, vol. 233, no. 1, p. 97-106.

SANTINI, S. M. et al. 2000. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. J Exp Med, vol. 191, no. 10, p. 1777-88.

SAYEED, M. M. 1996. Alterations in cell signaling and related effector functions in T lymphocytes in burn/trauma/septic injuries. Shock, vol. 5, no. 3, p. 157-66.

SAYEED, M. M. 2000. Signaling mechanisms of altered cellular responses in trauma, burn, and sepsis: role of Ca²⁺. Arch Surg, vol. 135, no. 12, p. 1432-42.

SCHAAF, B. et al. 2009. Mortality in human sepsis is associated with downregulation of Toll-like receptor 2 and CD14 expression on blood monocytes. Diagn Pathol, vol. 4, no. 12.

SCHILD, B. et A. Nilsson. 1970. Standardized burns in mice. Eur Surg Res, vol. 2, no. 1, p. 23-33.

SCHLUTER, B., W. Konig, M. Koller, G. Erbs et F. E. Muller. 1991. Differential regulation of T- and B-lymphocyte activation in severely burned patients. J Trauma, vol. 31, no. 2, p. 239-46.

SCHOENBERGER, S. P., R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa et C. J. Melief. 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. Nature, vol. 393, no. 6684, p. 480-3.

SCHWACHA, M. G. 2003. Macrophages and post-burn immune dysfunction. Burns, vol. 29, no. 1, p. 1-14.

SCHWACHA, M. G., A. Ayala et I. H. Chaudry. 2000. Insights into the role of gammadelta T lymphocytes in the immunopathogenic response to thermal injury. J Leukoc Biol, vol. 67, no. 5, p. 644-50.

SCHWACHA, M. G., A. Ayala, W. G. Cioffi, K. I. Bland et I. H. Chaudry. 1999. Role of protein kinase C in cyclic AMP-mediated suppression of T-lymphocyte activation following burn injury. Biochim Biophys Acta, vol. 1455, no. 1, p. 45-53.

SCHWACHA, M. G. et I. H. Chaudry. 2002. The cellular basis of post-burn immunosuppression: macrophages and mediators. Int J Mol Med, vol. 10, no. 3, p. 239-43.

SCHWACHA, M. G., C. S. Chung, A. Ayala, K. I. Bland et I. H. Chaudry. 2002. Cyclooxygenase 2-mediated suppression of macrophage interleukin-12 production after thermal injury. Am J Physiol Cell Physiol, vol. 282, no. 2, p. C263-70.

SCHWACHA, M. G., T. S. Samy, R. A. Catania et I. H. Chaudry. 1998. Thermal injury alters macrophage responses to prostaglandin E2: contribution to the enhancement of inducible nitric oxide synthase activity. J Leukoc Biol, vol. 64, no. 6, p. 740-6.

SCHWACHA, M. G., C. P. Schneider, K. I. Bland et I. H. Chaudry. 2001. Resistance of macrophages to the suppressive effect of interleukin-10 following thermal injury. Am J Physiol Cell Physiol, vol. 281, no. 4, p. C1180-7.

SCHWACHA, M. G. et S. D. Somers. 1998. Thermal injury-induced immunosuppression in mice: the role of macrophage-derived reactive nitrogen intermediates. J Leukoc Biol, vol. 63, no. 1, p. 51-8.

SENGUPTA, N. et E. Seto. 2004. Regulation of histone deacetylase activities. J Cell Biochem, vol. 93, no. 1, p. 57-67.

SERBINA, N. V., T. P. Salazar-Mather, C. A. Biron, W. A. Kuziel et E. G. Pamer. 2003. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. Immunity, vol. 19, no. 1, p. 59-70.

SHANKAR, S. et al. 2005. Interactive effects of histone deacetylase inhibitors and TRAIL on apoptosis in human leukemia cells: involvement of both death receptor and mitochondrial pathways. Int J Mol Med, vol. 16, no. 6, p. 1125-38.

SHAULIAN, E. et M. Karin. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. Nat Cell Biol, vol. 4, no. 5, p. E131-6.

SHELLEY, O., T. Murphy, H. Paterson, J. A. Mannick et J. A. Lederer. 2003. Interaction between the innate and adaptive immune systems is required to survive sepsis and control inflammation after injury. Shock, vol. 20, no. 2, p. 123-9.

SHERWOOD, E. R. et T. Toliver-Kinsky. 2004. Mechanisms of the inflammatory response. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, vol. 18, no. 3, p. 385-405.

SHIMAZU, R. et al. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. J Exp Med, vol. 189, no. 11, p. 1777-82.

SHKLOVSKAYA, E., B. Roediger et B. Fazekas de St Groth. 2008. Epidermal and dermal dendritic cells display differential activation and migratory behavior while sharing the ability

- to stimulate CD4+ T cell proliferation in vivo. J Immunol, vol. 181, no. 1, p. 418-30.
- SHORTMAN, K. et S. H. Naik. 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. Nat Rev Immunol, vol. 7, no. 1, p. 19-30 .
- SINGER, A. J. et R. A. Clark. 1999. Cutaneous wound healing. N Engl J Med, vol. 341, no. 10, p. 738-46.
- SINGER, A. J., S. A. McClain, B. R. Taira, J. L. Guerriero et W. Zong. 2008. Apoptosis and necrosis in the ischemic zone adjacent to third degree burns. Acad Emerg Med, vol. 15, no. 6, p. 549-54.
- SOEJIMA, K., F. C. Schmalstieg, H. Sakurai, L. D. Traber et D. L. Traber. 2001. Pathophysiological analysis of combined burn and smoke inhalation injuries in sheep. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, vol. 280, no. 6, p. L1233-41.
- SOLOMKIN, J. S. 1990. Neutrophil disorders in burn injury: complement, cytokines, and organ injury. J Trauma, vol. 30, no. 12 Suppl, p. S80-5.
- SONG, S. et al. 1997. Interleukin-10 inhibits interferon-gamma-induced intercellular adhesion molecule-1 gene transcription in human monocytes. Blood, vol. 89, no. 12, p. 4461-9.
- SOUMELIS, V. et Y. J. Liu. 2006. From plasmacytoid to dendritic cell: morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation. Eur J Immunol, vol. 36, no. 9, p. 2286-92.
- STEIN, M. D., D. N. Gamble, K. D. Klimpel, D. N. Herndon et G. R. Klimpel. 1984. Natural killer cell defects resulting from thermal injury. Cell Immunol, vol. 86, no. 2, p. 551-6.
- STEPHAN, R. N., P. J. Conrad, M. Saizawa, R. E. Dean et I. H. Chaudry. 1988. Prostaglandin E2 depresses antigen-presenting cell function of peritoneal macrophages. J Surg Res, vol. 44, no. 6, p. 733-9.
- STOIBER, D. et al. 1999. Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN-gamma. J Immunol, vol. 163, no. 5, p. 2640-7.
- SU, R. C., A. B. Becker, A. L. Kozyrskyj et K. T. Hayglass. 2008. Epigenetic regulation of established human type 1 versus type 2 cytokine responses. J Allergy Clin Immunol, vol. 121, no. 1, p. 57-63.e3.
- SUNDQUIST, M. et M. J. Wick. 2008. Salmonella induces death of CD8 α + dendritic cells but not CD11c^{int}CD11b⁺ inflammatory cells in vivo via MyD88 and TNFR1. J Leukoc Biol, vol. 84, no. 1, p. 10-18.
- TAIEB, A. et al. 2007. Intrinsic ability of GM+IL-4 but not Flt3L-induced rat dendritic cells to promote allogeneic T cell hyporesponsiveness. Clin Immunol, vol. 123, no. 2, p. 176-89.
- TAKAESU, G. et al. 2003. TAK1 is critical for I κ B kinase-mediated activation of the NF- κ B pathway. J Mol Biol, vol. 326, no. 1, p. 105-15.
- TAKEDA, K., T. Kaisho et S. Akira. 2003. Toll-like receptors. Annu Rev Immunol, vol. 21, no. 1, p. 335-76.

TAKEUCHI, S. et M. Furue. 2007. Dendritic cells: ontogeny. Allergol Int, vol. 56, no. 3, p. 215-23.

TAN, J. K. et H. C. O'Neill. 2005. Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. J Leukoc Biol, vol. 78, no. 2, p. 319-24.

TANIGUCHI, T. et A. Takaoka. 2002. The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. Curr Opin Immunol, vol. 14, no. 1, p. 111-6.

TEODORCZYK-INJEYAN, J. A., M. Cembrzynska-Nowak, S. Lalani, W. J. Peters et G. B. Mills. 1995. Immune deficiency following thermal trauma is associated with apoptotic cell death. J Clin Immunol, vol. 15, no. 6, p. 318-28.

TEODORCZYK-INJEYAN, J. A., B. G. Sparkes, G. B. Mills, R. E. Falk et W. J. Peters. 1987. Impaired expression of interleukin-2 receptor (IL2R) in the immunosuppressed burned patient: reversal by exogenous IL2. J Trauma, vol. 27, no. 2, p. 180-7.

TEODORCZYK-INJEYAN, J. A., B. G. Sparkes, G. B. Mills, W. J. Peters et R. E. Falk. 1986. Impairment of T cell activation in burn patients: a possible mechanism of thermal injury-induced immunosuppression. Clin Exp Immunol, vol. 65, no. 3, p. 570-81.

TILL, G. O. et al. 1989. Role of xanthine oxidase in thermal injury of skin. Am J Pathol, vol. 135, no. 1, p. 195-202.

TINSLEY, K. W. et al. 2003. Sepsis induces apoptosis and profound depletion of splenic interdigitating and follicular dendritic cells. J Immunol, vol. 171, no. 2, p. 909-14.

TOKYAY, R. et al. 1993. Postburn gastrointestinal vasoconstriction increases bacterial and endotoxin translocation. J Appl Physiol, vol. 74, no. 4, p. 1521-7.

TOLIVER-KINSKY, T. E., W. Cui, E. D. Murphey, C. Lin et E. R. Sherwood. 2005. Enhancement of dendritic cell production by fms-like tyrosine kinase-3 ligand increases the resistance of mice to a burn wound infection. J Immunol, vol. 174, no. 1, p. 404-10.

TOLIVER-KINSKY, T. E., C. Y. Lin, D. N. Herndon et E. R. Sherwood. 2003. Stimulation of hematopoiesis by the Fms-like tyrosine kinase 3 ligand restores bacterial induction of Th1 cytokines in thermally injured mice. Infect Immun, vol. 71, no. 6, p. 3058-67.

TOMITA, K., P. J. Barnes et I. M. Adcock. 2003. The effect of oxidative stress on histone acetylation and IL-8 release. Biochem Biophys Res Commun, vol. 301, no. 2, p. 572-7.

TONE, M., M. J. Powell, Y. Tone, S. A. Thompson et H. Waldmann. 2000. IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. J Immunol, vol. 165, no. 1, p. 286-91.

TOTH, B. et al. 2004. The role of gammadelta T cells in the regulation of neutrophil-mediated tissue damage after thermal injury. J Leukoc Biol, vol. 76, no. 3, p. 545-52.

TRAVER, D. et al. 2000. Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. Science, vol. 290, no. 5499, p. 2152-4.

TREMBLAY, P. et al. 1995. Differential effects of PKC inhibitors on gelatinase B and interleukin 6 production in the mouse macrophage. Cytokine, vol. 7, no. 2, p. 130-6.

- UNSINGER, J. et al. 2006. The role of TCR engagement and activation-induced cell death in sepsis-induced T cell apoptosis. J Immunol, vol. 177, no. 11, p. 7968-73.
- UTSUGI, M. et al. 2003. c-Jun N-terminal kinase negatively regulates lipopolysaccharide-induced IL-12 production in human macrophages: role of mitogen-activated protein kinase in glutathione redox regulation of IL-12 production. J Immunol, vol. 171, no. 2, p. 628-35.
- VAN DER POLL, T., S. M. Coyle, L. L. Moldawer et S. F. Lowry. 1996. Changes in endotoxin-induced cytokine production by whole blood after in vivo exposure of normal humans to endotoxin. J Infect Dis, vol. 174, no. 6, p. 1356-60.
- VAN KOOTEN, C. et J. Banchereau. 2000. CD40-CD40 ligand. J Leukoc Biol, vol. 67, no. 1, p. 2-17.
- VENET, F. et al. 2008. Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. J Leukoc Biol, vol. 83, no. 3, p. 523-35.
- VENET, F. et al. 2006. Human CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. J Immunol, vol. 177, no. 9, p. 6540-7.
- VIATOUR, P. et al. 2003. Cytoplasmic I κ B α increases NF- κ B-independent transcription through binding to histone deacetylase (HDAC) 1 and HDAC3. J Biol Chem, vol. 278, no. 47, p. 46541-8.
- VINDENES, H. A., E. Ulvestad et R. Bjerknes. 1998a. Concentrations of cytokines in plasma of patients with large burns: their relation to time after injury, burn size, inflammatory variables, infection, and outcome. Eur J Surg, vol. 164, no. 9, p. 647-56.
- VINDENES, H. A., E. Ulvestad et R. Bjerknes. 1998b. Concentrations of cytokines in plasma of patients with large burns: their relation to time after injury, burn size, inflammatory variables, infection, and outcome. Eur J Surg, vol. 164, no. 9, p. 647-56.
- VISINTIN, A. et al. 2001. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. J Immunol, vol. 166, no. 1, p. 249-55.
- VOELTER-MAHLKNECHT, S., A. D. Ho et U. Mahlknecht. 2005. Chromosomal organization and localization of the novel class IV human histone deacetylase 11 gene. Int J Mol Med, vol. 16, no. 4, p. 589-98.
- VOLK, H. D. et al. 1996. Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. Intensive Care Med, vol. 22 Suppl 4, no. S474-81.
- VON BOEHMER, H. 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. Nat Immunol, vol. 6, no. 4, p. 338-44.
- VREMEC, D. et al. 1997. The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. Eur J Immunol, vol. 27, no. 1, p. 40-4.
- VREMEC, D., J. Pooley, H. Hochrein, L. Wu et K. Shortman. 2000. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. J Immunol, vol. 164, no. 6, p. 2978-86.

VREMEC, D. et al. 1992. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. J Exp Med, vol. 176, no. 1, p. 47-58.

WAHLSTROM, K., J. Bellingham, J. L. Rodriguez et M. A. West. 1999. Inhibitory kappaB control of nuclear factor-kappaB is dysregulated in endotoxin tolerant macrophages. Shock, vol. 11, no. 4, p. 242-7.

WALD, D. et al. 2003. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. Nat Immunol, vol. 4, no. 9, p. 920-7.

WALZER, T., M. Dalod, S. H. Robbins, L. Zitvogel et E. Vivier. 2005. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". Blood, vol. 106, no. 7, p. 2252-8.

WEINMANN, A. S. et al. 2001. Nucleosome remodeling at the IL-12 p40 promoter is a TLR-dependent, Rel-independent event. Nat Immunol, vol. 2, no. 1, p. 51-7.

WEINMANN, A. S., S. E. Plevy et S. T. Smale. 1999. Rapid and selective remodeling of a positioned nucleosome during the induction of IL-12 p40 transcription. Immunity, vol. 11, no. 6, p. 665-75.

WEN, H., Y. Dou, C. M. Hogaboam et S. L. Kunkel. 2008. Epigenetic regulation of dendritic cell-derived interleukin-12 facilitates immunosuppression after a severe innate immune response. Blood, vol. 111, no. 4, p. 1797-804.

WEN, H., C. M. Hogaboam, J. Gaudie et S. L. Kunkel. 2006. Severe sepsis exacerbates cell-mediated immunity in the lung due to an altered dendritic cell cytokine profile. Am J Pathol, vol. 168, no. 6, p. 1940-50.

WEN, Y. D., W. D. Cress, A. L. Roy et E. Seto. 2003. Histone deacetylase 3 binds to and regulates the multifunctional transcription factor TFII-1. J Biol Chem, vol. 278, no. 3, p. 1841-7.

WILMORE, D. W. et L. H. Aulick. 1978. Metabolic changes in burned patients. Surg Clin North Am, vol. 58, no. 6, p. 1173-87.

WILMORE, D. W., J. M. Long, A. D. Mason Jr, R. W. Skreen et B. A. Pruitt Jr. 1974. Catecholamines: mediator of the hypermetabolic response to thermal injury. Ann Surg, vol. 180, no. 4, p. 653-69.

WOLFE, R. R. 1981. Review: acute versus chronic response to burn injury. Circ Shock, vol. 8, no. 1, p. 105-15.

WOLFE, R. R. et al. 1987. Regulation of lipolysis in severely burned children. Ann Surg, vol. 206, no. 2, p. 214-21.

WOOD, J. J. et al. 1984. Inadequate interleukin 2 production. A fundamental immunological deficiency in patients with major burns. Ann Surg, vol. 200, no. 3, p. 311-20.

WU, L., C. L. Li et K. Shortman. 1996. Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. J Exp Med, vol. 184, no. 3, p. 903-11.

WU, L., A. Nichogiannopoulou, K. Shortman et K. Georgopoulos. 1997. Cell-autonomous

- defects in dendritic cell populations of Ikaros mutant mice point to a developmental relationship with the lymphoid lineage. Immunity, vol. 7, no. 4, p. 483-92.
- WU, L. et al. 1995. Mouse thymus dendritic cells: kinetics of development and changes in surface markers during maturation. Eur J Immunol, vol. 25, no. 2, p. 418-25.
- WU, X., K. J. Woodside, J. Song et S. E. Wolf. 2004. Burn-induced gut mucosal homeostasis in TCR delta receptor-deficient mice. Shock, vol. 21, no. 1, p. 52-7.
- XU, Y., Y. Zhan, A. M. Lew, S. H. Naik et M. H. Kershaw. 2007. Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. J Immunol, vol. 179, no. 11, p. 7577-84.
- YAMAMOTO, M. et al. 2003. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. Nat Immunol, vol. 4, no. 11, p. 1144-50.
- YANAGAWA, Y. et K. Onoe. 2007. Enhanced IL-10 production by TLR4- and TLR2-primed dendritic cells upon TLR restimulation. J Immunol, vol. 178, no. 10, p. 6173-80.
- YEH, F. L., W. L. Lin, H. D. Shen et R. H. Fang. 1997. Changes in serum tumour necrosis factor-alpha in burned patients. Burns, vol. 23, no. 1, p. 6-10.
- YEH, F. L., W. L. Lin, H. D. Shen et R. H. Fang. 1999. Changes in circulating levels of interleukin 6 in burned patients. Burns, vol. 25, no. 2, p. 131-6.
- YONEYAMA, M. et al. 1998. Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. EMBO J, vol. 17, no. 4, p. 1087-95.
- YU, Z., W. Zhang et B. C. Kone. 2002. Histone deacetylases augment cytokine induction of the iNOS gene. J Am Soc Nephrol, vol. 13, no. 8, p. 2009-17.
- ZHANG, G. et S. Ghosh. 2002. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. J Biol Chem, vol. 277, no. 9, p. 7059-65.
- ZHANG, S. et Q. Wang. 2008. Factors determining the formation and release of bioactive IL-12: regulatory mechanisms for IL-12p70 synthesis and inhibition. Biochem Biophys Res Commun, vol. 372, no. 4, p. 509-12.
- ZHAO, Q. et al. 2005. The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the response of alveolar macrophages to lipopolysaccharide: attenuation of proinflammatory cytokine biosynthesis via feedback control of p38. J Biol Chem, vol. 280, no. 9, p. 8101-8.
- ZHAO, Q. et al. 2006. MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock. J Exp Med, vol. 203, no. 1, p. 131-40.
- ZHONG, H., M. J. May, E. Jimi et S. Ghosh. 2002. The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. Mol Cell, vol. 9, no. 3, p. 625-36.
- ZHOU, D. H., A. M. Munster et R. A. Winchurch. 1992. Inhibitory effects of interleukin 6 on immunity. Possible implications in burn patients. Arch Surg, vol. 127, no. 1, p. 65-8; discussion 68-9.

ZHOU, H. et al. 2007. Immune suppression via IL-4/IL-10-secreting T cells: a nontoxic property of anti-HIV agent trichosanthin. Clin Immunol, vol. 122, no. 3, p. 312-22.

ZHOU, L., A. A. Nazarian et S. T. Smale. 2004. Interleukin-10 inhibits interleukin-12 p40 gene transcription by targeting a late event in the activation pathway. Mol Cell Biol, vol. 24, no. 6, p. 2385-96.

ZWIERZINA, H., S. Schollenberger, M. Herold, F. Schmalzl et J. Besemer. 1992. Endogenous serum levels and surface receptor expression of GM-CSF and IL-3 in patients with myelodysplastic syndromes. Leuk Res, vol. 16, no. 12, p. 1181-6.

ANNEXE

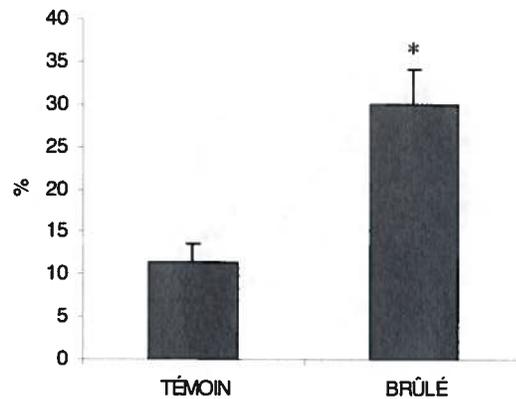


Figure 12 : Pourcentage de cellules CD11c⁺/Microsphères-FITC dans la rate au 10^e jour suivant la brûlure sévère. Des microsphères-FITC (diamètre de 1- μ m; Molecular Probes, Hornby, ONT, Canada) ont été diluées dans du PBS à une concentration de 0.1% (wt/vol). Au 7^e jour suivant la brûlure sévère, 50 μ L de cette suspension de microsphères-FITC a été injectée sous-cutané à 4 endroits différents au pourtour de la brûlure. Au 10^e jour, les souris ont été sacrifiées. Une solution de collagénase/DNase a été injectée dans les rates, qui avaient été préalablement isolées de chacune des souris. À partir de la suspension cellulaire totale de la rate, les CDs CD11c⁺ ont été identifiées par l'utilisation d'un Ac monoclonale anti-souris CD11c marqué à la R-phycoérythrine (R-PE). Par cytométrie en flux, le pourcentage de CDs CD11c⁺ ayant phagocyté les microsphères-FITC a été analysé au FACScan®. Les résultats sont exprimés en pourcentage de CD11c⁺/microsphères-FICT, moyenne \pm SEM (n \geq 5 souris). *, p < 0.05 par ANOVA.

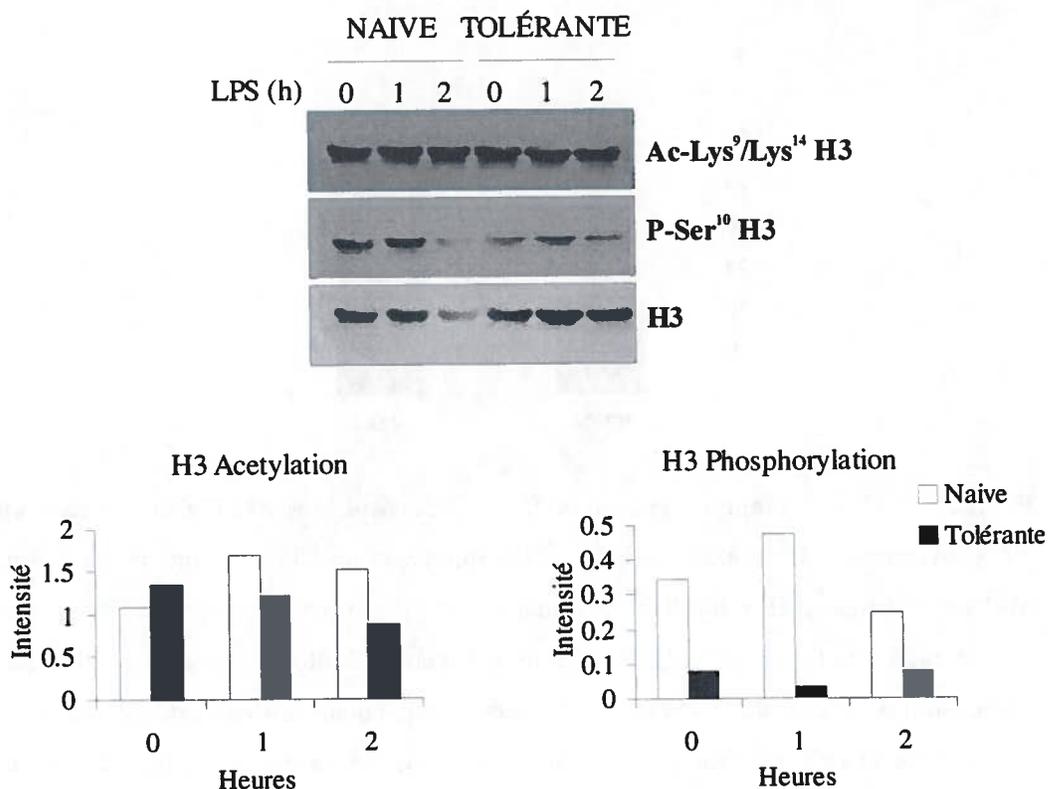


Figure 13 : Effet de la tolérance aux LPS sur les niveaux d'acétylation et de phosphorylation de l'histone H3 chez les FLDCs. Les échantillons ont ensuite été chargés sur un gel de polyacrylamide 10% avant d'être transférés sur une membrane de nitrocellulose. Les sites non spécifiques ont été bloqués à l'aide d'une solution de TBS-Tween contenant 5% de lait écrémé en poudre pour 1h à température pièce. La membrane a été lavée puis incubée pour toute la nuit à 4°C avec une solution de TBS-Tween contenant 1 µg/mL d'Ac polyclonal de lapin anti-acetyl-histone H3 (lysine 9/lysine14) (Cell Signaling, Pickering, ONT, Canada) ou d'Ac polyclonal de lapin anti-phospho-histone H3 (sérine 10) (Cell signaling). La membrane a été lavée puis incubée pour 1h à température pièce avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à la HRP 1/10 000 dans une solution de TBS-Tween contenant 5% de lait écrémé en poudre. La membrane a par la suite été lavée puis révélée avec une solution de ECL+. La membrane a ensuite été réhybridée avec un anticorps anti-histone H3 totale (Cell Signaling) afin de vérifier le chargement des échantillons dans chacun des puits. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

