

Université de Montréal

L'immuno-modulation et l'immuno-suppression chez les grands brûlés

Par

Zeid Kuzbari

Département de sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise en sciences biomédicales,
option médecine expérimentale

Juillet 2018

© Zeid Kuzbari, 2018

Résumé

Les brûlures induisent une activation inflammatoire intense menant à un épuisement du système immunitaire des patients. Ceci génère une phase anti-inflammatoire immunosuppressive ouvrant la porte aux infections nosocomiales. Il a déjà été observé dans notre laboratoire, à partir d'échantillons de 25 patients grands brûlés (GB), une altération des monocytes, des niveaux de cytokines pro- et anti- inflammatoires et des fonctions des lymphocytes B (LB). Nous émettons l'hypothèse que les brûlures conduisent à une hyperactivation des cellules présentatrices d'antigènes (APC) qui génèrent un état immunosuppresseur. Nous proposons également que l'état inflammatoire des patients soit influencé par le microbiome. Nos objectifs sont d'évaluer la modulation immunologique des leucocytes périphériques, en particulier les APC, d'optimiser les techniques d'analyse du microbiome sanguin et d'étudier les populations bactériennes périphériques des patients.

Nos expériences *in vitro* révèlent qu'en présence de sérum de patients GB, les monocytes adoptent un profil régulateur de l'inflammation; et les LB prolifèrent moins et produisent moins d'IgA, IgG et IgM. Les monocytes stimulent la prolifération des LB par des interactions cellulaires mais inhibent la sécrétion d'anticorps. La concentration de BAFF soluble chez les patients GB augmente 5 jours post-brûlure et ceci pourrait établir un lien entre les monocytes et la dérégulation des LB. Les techniques d'extraction et de détection de l'ADN bactérien à partir du sang et de la peau ont été optimisées. La quantité d'ADN total en circulation varie post-brûlure mais la quantité d'équivalents bactériens dans le sang des patients GB n'est pas modifié.

Une meilleure compréhension de l'état d'activation du système immunitaire après une brûlure et son interaction avec le microbiome est très importante. Ceci permettra de développer de nouveaux traitements afin de supporter les fonctions immunitaires des patients afin de réduire les infections sévères résultant de l'épuisement immunologique.

Mots clés: Brûlure, inflammation, immunosuppression, infection, monocyte, macrophage, lymphocyte B, microbiome, bactérie, ADN.

Abstract

Burns induce an intense inflammatory activation leading to the exhaustion of patients' immune system. In turn, this phenomenon generates an immunosuppressive anti-inflammatory phase that opens the floodgates to nosocomial infections. Our laboratory has already analyzed samples of 25 patients with severe burns and has observed an alteration of monocytes, pro- and anti-inflammatory cytokine levels and functions of B cells. We hypothesize that burns lead to the hyperactivation of antigen-presenting cells (APCs) which subsequently generates an immunosuppressive state. We also propose that the inflammatory state of patients is influenced by the microbiome. Our objectives are to evaluate the immunological activation of peripheral leukocytes, APCs in particular; optimize the analysis techniques of blood microbiome and study peripheral bacterial populations in burned patients.

Our *in vitro* experiments reveal that, in the presence of burned patient serum, monocytes adopt a regulatory profile of inflammation; whereas B cells proliferate less and produce less IgA, IgG and IgM. Monocytes stimulate the proliferation of B cells through cellular interactions but also inhibit antibody secretion. Soluble BAFF concentration in burned patients increases 5 days post-burn and this could establish a link between monocytes and B cell deregulation. Extraction and detection techniques of bacterial DNA from blood and skin have been optimized. The amount of circulating total DNA is modulated post-burn but the amount of bacterial equivalents in the blood of burned patients is unchanged.

It is crucial to obtain a better knowledge on the activation status of the immune cells and their interactions with the microbiome. This will allow the development of novel immune therapy to correct the immune exhaustion present in burn patients.

Key words: Burn, inflammation, immunosuppression, infection, monocyte, macrophage, B lymphocyte, microbiome, bacteria, DNA.

Table des matières

Chapitre 1. Introduction	1
1.1 La problématique des patients grands brûlés	1
1.1.1 L'épidémiologie des brûlures dans le monde.....	1
1.1.2 Les caractéristiques cliniques	2
A) Surface de brûlure	2
B) Profondeur et degrés de brûlure	3
1.1.3 Conséquences physiologiques d'une brûlure.	4
1.1.4 Le système immunitaire et les infections chez les patients grands brûlés.	6
1.2 La prise en charge des patients grands brûlés	8
1.2.1 Réanimation liquidienne.....	8
1.2.2 Traitements	10
A) Traitements antimicrobiens.....	10
B) Autres traitements	10
1.2.3 Débridement précoce et greffes de peau chez les patients grands brûlés.	11
1.3 Le système immunitaire inné	13
1.3.1 Qu'est ce qui constitue le système immunitaire inné?	13
1.3.2 Les monocytes	14
A) Monocytes classiques.....	14
B) Monocytes intermédiaires	15
C) Monocytes non-classiques.....	16
1.3.3 Les macrophages	17
A) Macrophage M1	17
B) Macrophage M2	18
1.3.4 Les cellules myéloïdes suppressives.....	19

1.4 Le système immunitaire adaptatif.....	20
1.4.1 L'activation de la réponse adaptative par les cellules dendritiques	20
1.4.3 Les lymphocytes T.....	21
1.4.4 Les lymphocytes B	24
1.5 Modifications du système immunitaire chez les patients grands brûlés.....	26
1.5.1 L'immunité innée chez les patients grands brûlés.....	26
A) Syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS)	26
B) Syndrome de réponse anti-inflammatoire compensatoire	28
1.5.2 L'immunité adaptative chez les patients GB.....	29
A) Les lymphocytes T chez les patients GB	29
B) L'immunité humorale par les lymphocytes B chez les patients GB	29
1.6 Résultats antérieurs	30
1.6.1 Altérations des APC lors de l'activation inflammatoire chez les patients GB.....	30
1.6.2 Récapitulatif des modulations immunologiques chez les patients GB	33
1.7 Le microbiome et son importance	34
1.7.1 Caractérisation du microbiome.....	34
1.7.2 Les techniques d'analyse du microbiome.....	34
A) Le gène codant l'ARNr 16S.....	34
B) La quantification des bactéries par qPCR	35
1.8 Les interactions entre l'hôte et le microbiome	36
1.8.1 Le microbiome intestinal	36
A) Les relations entre le microbiome intestinal et l'hôte.....	36
B) L'impact du microbiome intestinal chez les patients GB	37
1.8.2 Le microbiome de la peau.....	37
A) Les relations entre le microbiome de la peau et l'hôte	37
B) L'impact du microbiome de la peau chez les GB	38
1.8.3 Le microbiome du sang	39
1.8.4 Récapitulatif du microbiome chez les patients GB.....	40

Chapitre 2. Hypothèse et objectifs du projet	41
2.1 Hypothèses	41
2.2 Objectifs	41
Chapitre 3. Matériel et méthodes.....	42
3.1 Recrutement des patients et obtention des échantillons biologiques.....	42
3.2 Manipulation <i>in vitro</i> des cellules immunitaires de donneurs sains en présence de sérum de patients GB.....	42
3.3 Analyse du phénotype des cellules immunitaires par cytométrie en flux.....	44
3.4 Analyse des facteurs solubles dans le plasma et les surnageants par ELISA..	45
3.5 Extraction de l'ADN à partir d'échantillons de sang et de la peau	46
3.6 Détection et quantification de l'ADN bactérien par qPCR.....	47
3.7 Statistiques.....	48
Chapitre 4. Résultats	49
4.1 Le sérum de patients GB altère le phénotype des monocytes <i>in vitro</i> , mais n'affecte pas le phénotype des macrophages.	49
4.2 Le sérum de patients GB n'altère pas l'expression de CD40L par les LT <i>in vitro</i>	52
4.3 Le sérum de patients GB et les monocytes/macrophages altèrent les fonctions des LB.....	53
4.4 L'extraction, la détection et la quantification des bactéries du sang et de la peau.	57
4.5 La quantité d'ADN total circulant est modifiée au cours du temps chez les patients GB, mais la quantité d'ADN bactérien n'est pas modifiée.	59

Chapitre 5. Discussion..... 61

5.1 Récapitulatif des résultats obtenus..... 61

5.2 L'environnement inflammatoire des patients GB altère la différenciation des monocytes mais n'affecte pas la polarisation des macrophages. 62

5.3 Le milieu inflammatoire sérique des patients GB n'altère pas l'expression de CD40L par les LT. 64

5.4 L'environnement inflammatoire des patients GB et les monocytes/macrophages altèrent les fonctions des LB..... 65

5.5 La mise au point des techniques d'extraction et de quantification de l'ADN bactérien du sang et de la peau..... 68

5.6 La concentration d'ADN total périphérique est modifiée au cours du temps chez les patients GB, mais le nombre d'équivalents bactériens n'est pas altéré. .. 70

Chapitre 6. Conclusions 72

Bibliographie..... 75

Annexe i

Liste des figures

Figure 1. Les degrés de brûlures.....	4
Figure 2. La modulation inflammatoire des patients GB au cours du temps.	8
Figure 3. Représentation des sous-types de monocytes et des macrophages M1 et M2.	19
Figure 4. Résultats antérieurs du laboratoire présentant l'altération des populations monocytaires et des signaux anti-inflammatoires affectant la biologie des macrophages en périphérie chez les patients GB.	31
Figure 5. Résultats antérieurs du laboratoire présentant la modulation des signaux affectant la biologie des lymphocytes et l'altération des fonctions des LB dans le sang/plasma des patients GB.	32
Figure 6. Les monocytes classiques d'un donneur sain se différencient au sous-type intermédiaire en présence du sérum GB.....	50
Figure 7. Le phénotype et la polarisation des macrophages d'un donneur sain ne sont pas altérés en présence de sérum GB.	51
Figure 8. L'expression de CD40L soluble et de surface par les LT de donneurs sains n'est pas modifiée en présence de sérum de patients GB.....	52
Figure 9. La prolifération des LB d'un donneur sain est diminuée en présence de sérum GB et ceci est partiellement corrigé en présence de monocytes/macrophages.....	54
Figure 10. La production d'IgA, IgG et IgM par les LB d'un donneur sain est diminuée en présence de sérum GB et diminue davantage en présence de monocytes/macrophages.	55
Figure 11. L'augmentation tardive de BAFF soluble <i>in vivo</i> et les interactions cellulaires avec les monocytes/macrophages <i>in vitro</i> sont associées à une altération des fonctions des LB.	56
Figure 12. La technique de qPCR permet de détecter l'ADN 16S bactérien à partir du sang et de la peau de sujets sains.	58
Figure 13. L'ADN total du sang diminue post-brûlures mais le nombre d'équivalents bactériens en circulation n'est pas significativement modifié.	59
Figure 14. La trajectoire immunologique des patients GB à travers le temps.	73

Abréviations

- ARNr: ARN ribosomal
- ADN 16S : gène de l'ADN qui code pour l'ARNr 16S
- APC: Cellule présentatrice d'antigène
- BAFF: *B-cell-activating factor of the tumour-necrosis-factor family*
- BCR: *B cell receptor*
- CARS: *Compensatory anti-inflammatory response syndrome*
- CD40L: CD40 ligand
- sCD40L: CD40L soluble
- CFSE: Carboxyfluorescein succinimidyl ester
- CMH: complexe majeur d'histocompatibilité
- DC: Cellule dendritique
- DI: Indice de division
- d0/d2/d3/d5/d6/d12/d14: Jour 0/2/3/5/6/12/14
- E.coli*: *Escherichia coli*
- GB: grand brûlé
- GC: centres germinaux
- IgA/IgD/IgE/IgG/IgM: Immunoglobuline A/D/E/G/M
- IL: Interleukine
- IU: Unité internationale
- LB: Lymphocyte B
- LPS: lipopolysaccharide
- LT: Lymphocyte T
- MFG-E8: *Milk fat globule epidermal growth factor-8*
- PBMC: *Peripheral blood mononuclear cell*

- qPCR: *quantitative Polymerase Chain Reaction*
- RL: Lactate Ringer
- Sérum GB: sérum de patients grands brûlés
- Sérum ND: sérum de donneurs normaux
- SIRS: *Systemic inflammatory response syndrome*
- TBSA: Surface corporelle totale brûlée (*Total Body Surface area*)
- TCR: T Cell Receptor
- Th: *T-helper cell*
- TLR: *Toll-Like Receptors*
- VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

Remerciements

Je remercie mon directeur Dr. Jean François Cailhier et mon co-directeur Dr. Réjean Lapointe pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires et m'avoir offert la responsabilité de travailler sur ce projet. Je remercie les membres des deux laboratoires de leur soutien tout au long de ma formation en maîtrise. Je remercie la Fondation des pompiers du Québec pour les grands brûlés pour le financement de ce projet de recherche.

Chapitre 1. Introduction

1.1 La problématique des patients grands brûlés

1.1.1 L'épidémiologie des brûlures dans le monde

Malgré les nombreux avancements des traitements des patients grands brûlés au cours des dernières décennies, les brûlures sévères demeurent un traumatisme dévastateur, très commun dans le monde et difficile à gérer. Malgré la baisse de la mortalité, la morbidité causée surtout par des infections nosocomiales restent toujours une complication majeure.

Aujourd'hui à l'échelle mondiale, on estime plus que 11 millions d'incidents de brûlures et plus de 180 000 décès à chaque année [1]. Il s'agit une baisse par rapport à 2008-2009 qui a vu plus que 300 000 décès à cause des brûlures [2, 3]. La majorité des cas se produisent dans les pays à faible revenu et les pays en voie de développement [4]. En fait, l'Asie du sud-est compte pour elle seule plus que la moitié des morts reliées aux brûlures [5]. Cependant, ces nombres au niveau mondial reflètent une sous-estimation de la réalité vu que les pays en développement ne collectent pas les données statistiques d'une manière fiable et consistante.

Aux États-Unis, aux alentours de 450 000 cas de brûlures nécessitent une attention médicale à chaque année, dont 40 000 sont hospitalisés et environ 3400 à 4000 décèdent [6]. Toutefois, les traitements de brûlures aux États-Unis coutent \$1 milliard annuellement et ne préviennent pas complètement les infections bactériennes qui s'ensuivent suite aux brûlures [6]. Au Canada, 3200 cas de brûlures sévères ont été signalés en 2005-2006 selon l'Alliance Canadienne des Patients en Dermatologie (ACPD). D'après la fondation des pompiers du Québec, environ 300 patients grands brûlés (GB) sont admis et traités dans les deux centres des grands brûlés du Québec à chaque année [7].

Les statistiques montrent que 70% des victimes de brûlures sont de sexe masculin, mais les victimes de sexe féminin ont un taux de survie moins élevé [8, 9]. Des études montrent également que les personnes âgées ont une mortalité plus élevée que les jeunes adultes [9]. Au Canada, les adultes âgés de 40 à 49 ans sont les victimes les plus communes suivis par les enfants. L'ACPD compte plus que 10 000 enfants brûlés ayant été admis aux hôpitaux canadiens entre 1994 et 2003.

Différents types de brûlures peuvent se produire selon l'insulte thermique. Il existe les brûlures par les liquides chauds qu'on observe le plus souvent, les brûlures de contact avec un objet chaud, les brûlures par flamme ou explosions, les brûlures chimiques, les brûlure par électricité et enfin par les radiations des coups de soleil. La brûlure peut entraîner plusieurs complications comme la défaillance multiviscérale; l'hypoxie due à l'inhalation de fumée; l'insuffisance respiratoire, l'insuffisance rénale, et/ou les infections comme la cellulite, la pneumonie et le sepsis. En outre, le pronostic et les risques de morbidité et mortalité sont largement influencés par des facteurs comme l'âge, le sexe, la surface de brûlure et la profondeur des brûlures chez les patients [10, 11].

1.1.2 Les caractéristiques cliniques

A) Surface de brûlure

Un des paramètres de sévérité les plus importants à déterminer chez les patients GB est le pourcentage de la surface corporelle totale brûlée (en anglais "% TBSA": *Total Body Surface area*). Ce pourcentage est typiquement calculé avec la règle des "neuf" de Wallace qui vise les adultes. Cette méthode stipule que la tête correspond à 9% de la surface corporelle, les faces antérieure et postérieure du tronc comptent pour 18% chacune, les jambes 18% chacune, les bras 9% chacun, et enfin le périnée est de 1%. En revanche cette règle n'est pas assez précise considérant que ces pourcentages peuvent varier selon l'âge de l'individu, surtout dans le cas des enfants. Par contre la table de Lund et Browder est adaptée aux variations corporelles qui viennent avec l'âge et est donc la méthode la plus précise pour calculer le pourcentage de surface brûlée. Il existe aussi la méthode de "palmar surface area" (PSA) dont l'estimation se base sur la paume comme

étant 1% de la surface corporelle [12]. Cependant le PSA est uniquement fiable pour les petites brûlures de moins de 15% TBSA et est sujet à des variations selon l'indice de masse corporelle surtout chez les personnes obèses [13]. Il est primordial d'estimer de façon précise le % TBSA afin de déterminer le volume de liquide nécessaire pour la réanimation. Dans notre présente étude, un des critères d'inclusion des patients GB est un TBSA de 20% et plus.

B) Profondeur et degrés de brûlure

En plus du TBSA, la profondeur de la brûlure constitue un paramètre essentiel pour le diagnostic, le traitement et le besoin d'une intervention chirurgicale chez les patients. Il existe trois degrés de brûlure selon l'atteinte des trois couches de la peau: l'épiderme, le derme et l'hypoderme [14].

La brûlure du premier degré touche uniquement la couche cutanée externe de la peau qu'on nomme l'épiderme. Ces brûlures superficielles sont causées fréquemment par l'exposition prolongée au rayonnement ultraviolet du soleil. Ces brûlures peuvent exiger une attention médicale, mais guérissent typiquement en une semaine et ne nécessitent que rarement une hospitalisation. Ainsi les individus atteints de brûlures du premier degré ne sont pas considérés comme patients grands brûlés.

La brûlure du deuxième degré se divise en 2 types: la brûlure superficielle et la brûlure profonde. La brûlure du deuxième degré superficielle est généralement la plus douloureuse. Elle endommage non seulement l'épiderme, mais s'attaque aussi à la deuxième couche appelée le derme. Dans ce cas, seulement la partie superficielle du derme est touchée, donc la cicatrisation est minimale et la guérison prend 2 à 3 semaines. Par contre, la brûlure du deuxième degré profonde détruit une plus grosse partie du derme et lèse les capillaires sanguins, les follicules pileux et les glandes sébacées. La guérison peut prendre jusqu'à deux mois et les greffes de peau sont envisageables.

La brûlure du troisième degré détruit entièrement l'épiderme et le derme en atteignant aussi la troisième couche de la peau: l'hypoderme. Les patients brûlés au troisième degré n'éprouvent pas de douleur à cause de la destruction des terminaisons nerveuses. Ce cas

sollicite souvent une intervention chirurgicale sous forme d'une greffe de peau. Les cas les plus extrêmes conduisent potentiellement au besoin d'amputation s'il existe un compromis vasculaire.

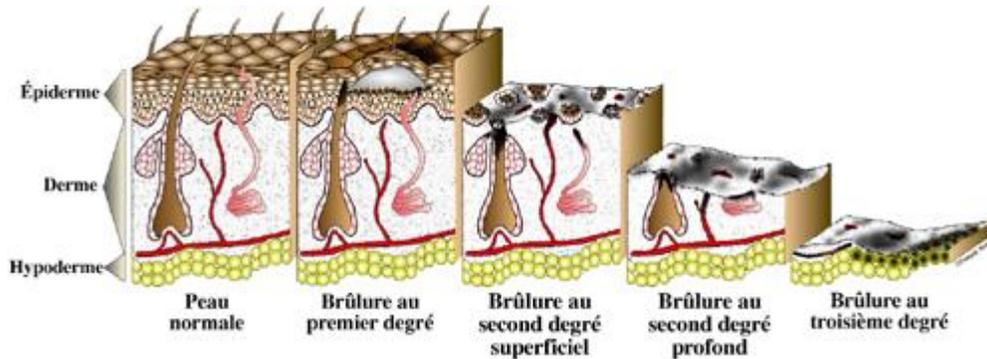


Figure 1. Les degrés de brûlures

Tiré de MedEspoir, disponible: <https://www.medespoir.ca/traitement-brulures-tunisie/> [15]

1.1.3 Conséquences physiologiques d'une brûlure.

Le traumatisme inflammatoire chez les patients brûlés est médié via plusieurs phénomènes physiologiques post-brûlure. La nécrose tissulaire est une des caractéristiques les plus évidentes suite au choc thermique. La plaie est typiquement divisée en trois parties: la zone de coagulation au centre, la zone de stase autour du centre et la zone d'hyperémie [16]. La zone centrale de coagulation constitue la partie la plus nécrosée d'une manière irréversible due à la destruction des vaisseaux sanguins et à l'ischémie. La zone de stase correspond à une partie endommagée avec une réduction de la circulation et de la perfusion tissulaire. Cette zone peut être récupérée si la réanimation est adéquate. Dans le contraire, une nécrose permanente s'installe. Enfin, la zone d'hyperémie se rétablit généralement grâce à l'augmentation du flux sanguin et de la perfusion à cet endroit [10].

Le choc thermique induit des effets locaux et systémiques sur les mécanismes cellulaires. Le dysfonctionnement des membranes cellulaires conduit à la réduction du potentiel transmembranaire. D'où la dérégulation de l'activité des protéines transmembranaires comme la pompe Na-K ATPase qui a pour effet de favoriser l'influx de sodium et d'eau

intracellulaire et l'efflux extracellulaire de potassium [10]. Les brûlures sévères stimulent la relâche de facteurs vasoactifs et inflammatoires comme l'histamine, les prostaglandines, les leucotriènes et le thromboxane. Ces médiateurs mènent à "une vasoconstriction locale, une vasodilatation systémique et une augmentation de la perméabilité capillaire" [17]. Ces altérations au niveau cellulaire et vasculaire jouent un rôle important dans la réduction du débit cardiaque, l'hypovolémie et la formation d'œdème observés chez les patients GB [17]. L'œdème est un gonflement des tissus provoqué par le transfert de liquide du plasma circulant vers le milieu interstitiel. Ce phénomène est aussi amplifié avec la réanimation liquidienne avec des liquides à faible pression oncotique [18]. La perte du plasma intravasculaire et son transfert vers les tissus endommagés sont liés à l'augmentation de la perméabilité des capillaires et à l'augmentation de la pression interstitielle post-brûlure [19].

Les brûlures induisent une augmentation dramatique du stress oxydant due à la production de dérivés réactifs de l'oxygène ("*Reactive oxygen species*" : ROS) et d'azote ("*Reactive Nitrogen species*" : RNS) [20]. Des études montrent que l'activation et l'accumulation de neutrophiles dans plusieurs tissus après la brûlure sont associées à la production de ROS. Malgré leurs effets bénéfiques antimicrobiens contre les pathogènes, les ROS causent des dommages substantiels aux cellules via la peroxydation des lipides membranaires et la dégradation de l'ADN. Ainsi, une concentration élevée de ROS inflige des blessures aux globules rouges et aux organes comme les poumons, menant possiblement à une défaillance multiviscérale [21]. Les études sur l'augmentation des RNS comme l'oxyde nitrique (NO), un médiateur vasoactif, montrent un effet régulateur de l'œdème et des événements vasculaires post-brûlure, chez l'homme comme que dans les modèles animaux [22, 23].

Les brûlures, surtout lorsqu'elles sont accompagnées d'une inhalation de fumée, infligent des dégâts importants sur les poumons et le cerveau. Les gaz toxiques et asphyxiants comme le monoxyde de carbone et le cyanure d'hydrogène sont souvent impliqués dans l'attaque aux poumons chez les patients brûlés. Les effets nocifs incluent l'obstruction du flux d'air, l'œdème pulmonaire, le bronchospasme, l'atélectasie, la broncho-constriction, la pneumonie, et peuvent mener au syndrome de détresse respiratoire aigu et l'insuffisance respiratoire. [6, 10, 16].

Un des traits flagrant chez les patients GB est l'augmentation dramatique du métabolisme de base. Le besoin calorique s'accroît et la dépense énergétique peut doubler [24]. Ainsi la consommation d'oxygène, le catabolisme des muscles et la dégradation de protéines augmentent significativement suite aux brûlures. Le catabolisme et la perte dramatique de protéines mènent à la diminution de la masse maigre des patients GB [25]. Les patients sont également hyperglycémiques dus à une augmentation de la résistance à l'insuline. L'hypermétabolisme des patients GB est largement associé aux complications infectieuses comme la pneumonie et le sepsis [25]. Cette condition d'hypermétabolisme peut persister même après le congé du patient. Dans le cas des patients pédiatriques, cette situation peut durer jusqu'à 3 ans [26].

D'autres modifications pathophysiologiques observables incluent une dérégulation de l'activité cérébrale, hépatique, rénale et gastro-intestinale [6, 16].

1.1.4 Le système immunitaire et les infections chez les patients grands brûlés.

Les brûlures sévères brisent les barrières physiques constituant la peau et exposent les tissus et la circulation à l'infiltration de pathogènes externes. En plus des événements physiologiques mentionnés ci-dessus, une cascade de modulations immunologiques est également déclenchée et elles varient tout au long de l'hospitalisation des patients. Les chocs thermiques déclenchent ainsi un état pro-inflammatoire appelé le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS). Cette réponse pro-inflammatoire se caractérise par une hyperactivation du système immunitaire tellement importante qu'elle est suivie par le syndrome de réponse compensatoire anti-inflammatoire (CARS) [24]. Cette réponse compensatoire est caractérisée par une fatigue importante du système immunitaire entraînant un état d'immunosuppression chez le patient GB [27]. Durant cette phase, les patients sont susceptibles aux infections nosocomiales et à la défaillance multiviscérale. Les patients GB sont donc souvent victimes de différents types d'infections bactériennes ou fongiques. En effet, les infections sont jusqu'à aujourd'hui la principale cause de morbidité et de mortalité chez les patients GB [28, 29].

Staphylococcus aureus et *Pseudomonas aeruginosa* sont parmi les espèces bactériennes les plus causales des infections chez les patients GB [26]. Les propriétés nocives et invasives de ces espèces bactériennes comprennent la motilité accordée par les flagelles, ainsi que la production de toxines, d'enzymes protéolytiques et d'hémolysines qui tuent les globules rouges [30, 31]. Parmi les infections fongiques retrouvées chez les patients GB, *Candida spp* et *Aspergillus spp* sont les levures les plus communes [32].

Les infections majeures pouvant survenir chez les patients GB sont les infections de la plaie, la pneumonie et le choc septique, complication plus sévère.

L'infection de la plaie est souvent l'initiatrice des infections systémiques qui surviennent par la suite comme le sepsis. Une invasion de pathogènes au niveau des lésions ralentit le processus d'épithélialisation et peut s'étendre à travers le derme et l'hypoderme. Les infections de la plaie peuvent toucher les sites non excisés, excisés et greffés [33]. Dans le cas d'une cellulite, l'infection bactérienne envahit même la peau saine et donc propage l'inflammation au-delà du site brûlé. Un prélèvement par écouvillon ou une biopsie tissulaire peuvent être effectués pour suivre le développement de l'infection des plaies [32]. Notons qu'il existe des différences entre la colonisation de la plaie et l'infection de la plaie selon l'ABA (American Burn Association). L'infection de la plaie est défini comme ayant une concentration de bactéries assez élevée, soit 10^5 bactéries/g de tissu [24]. Une évaluation histologique des biopsies permettent de déterminer s'il s'agit d'une colonisation ou d'une infection de la plaie [34].

Une pneumonie est une insulte inflammatoire causée par une infection des voies aériennes inférieures par des microorganismes. Les pneumonies se manifestent fréquemment chez les patients GB, surtout chez les patients ayant soufferts de blessures pulmonaires par inhalation [26, 35].

Le choc septique correspond au dysfonctionnement des organes suite à l'hypoperfusion à cause d'une bactériémie et est la cause principale de mortalité des patients GB aux soins intensifs [29, 32, 36, 37]. L'apparition du choc septique est souvent l'effet secondaire des stress immuns cumulés dont la dérégulation du système immunitaire, les infections initiales au niveau de la plaie et la pneumonie. L'infection associée aux cathéters intraveineux est très fréquemment une source de sepsis chez les patients GB [38-40]. En

effet, plusieurs études montrent l'utilité de mesures antiseptiques dans l'utilisation des cathéters veineux centraux qui sont souvent une source d'infection et de mortalité chez les patients GB [41, 42].

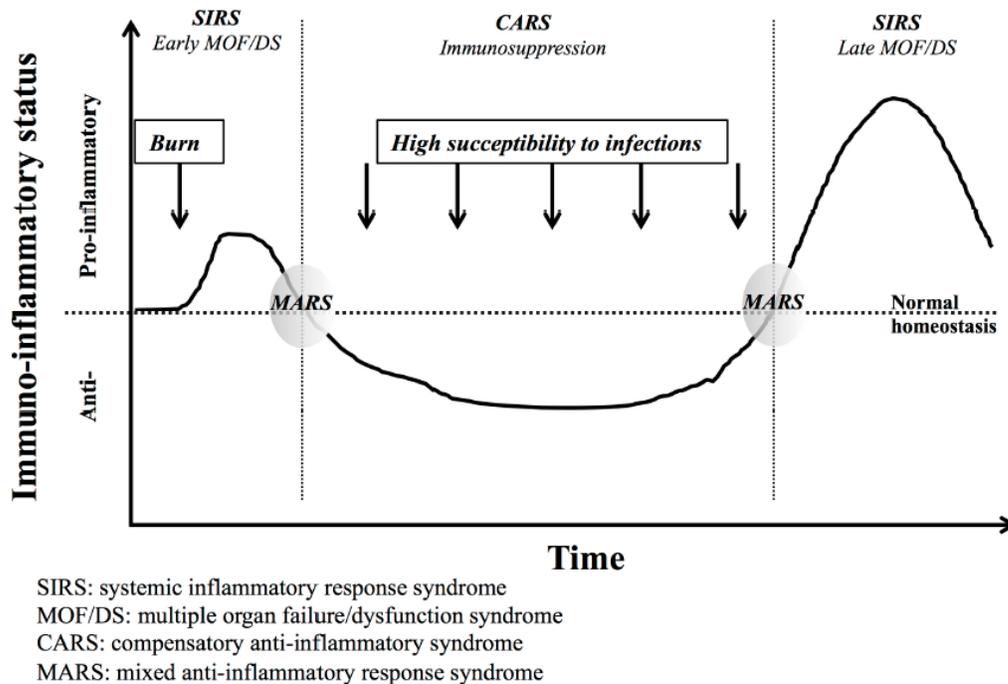


Figure 2. La modulation inflammatoire des patients GB au cours du temps.

1.2 La prise en charge des patients grands brûlés

1.2.1 Réanimation liquidienne

La réanimation liquidienne est essentielle pour compenser la contraction et la fuite de plasma en circulation pour les brûlures avec TBSA > 20%. Les formules les plus communes en clinique sont Parkland, Brooke, Evans et Monafó. Parmi ces options, la formule de Parkland a été la stratégie la plus utilisée pendant des décennies [43, 44].

Deux types de solutés sont envisageables pour l'expansion volumique, les cristalloïdes et les colloïdes. Les cristalloïdes sont des solutions salines pouvant être hypotoniques,

isotoniques ou hypertoniques selon le besoin, mais à faible pression oncotique. La solution "*normal salin*" est isotonique, donc ayant une osmolarité similaire au sang, soit une concentration de 154 mmol/L de chlorure de sodium. Mais le cristalloïde le plus prévalent chez les patients brûlés est la solution de Lactate Ringer (RL) qui contient un mélange de sodium, chlorure et lactate. Le volume de RL utilisée selon la méthode de Parkland est de 4mL/Kg/%TBSA chez les adultes dans les 24h initiales post-brûlures [44]. Malgré le fait que le RL permet l'augmentation rapide du volume intravasculaire, ce soluté est une solution isotonique, voire même légèrement hypotonique, qui induit une dilution considérable de l'albumine. D'où la possibilité d'effets secondaires graves tels que l'aggravation de l'œdème suite à la fuite vers le milieu interstitiel, l'oligurie, l'insuffisance rénale, des troubles cardiorespiratoires et l'acidose. De plus, la formule de Parkland sous-estime souvent le volume de liquide requis et donc la quantité injectée en pratique est souvent supérieure aux prédictions théoriques. Ainsi, la réanimation excessive peut mener au syndrome du compartiment [45], et activer les neutrophiles favorisant l'apparition du syndrome de détresse respiratoire aiguë chez les patients GB [46]. Une des alternatives implique l'utilisation de solutés salins hypertoniques qui permettraient d'augmenter l'osmolalité du plasma et réduire l'œdème cellulaire [17]. Cependant, certaines études révèlent que les solutions hypertoniques sont associées à un plus haut risque d'insuffisance rénale et de mortalité chez les patients GB [47]. L'autre solution est l'utilisation de colloïdes en tandem des cristalloïdes, souvent après les 24h initiales post-brûlure. Les colloïdes utilisés en clinique sont typiquement de l'albumine ou du plasma frais congelé, et permettent de maintenir une pression oncotique suffisamment élevée. Théoriquement les colloïdes, en tant que solutions oncotiques, font augmenter le volume intravasculaire, sans augmenter le volume interstitiel responsable des œdèmes [48, 49]. En combinaison, les colloïdes peuvent ainsi limiter l'extravasation des cristalloïdes vers le milieu interstitiel. En revanche, les colloïdes sont beaucoup moins utilisés que les cristalloïdes à cause des coûts plus élevés et des études qui contestent les effets bénéfiques des colloïdes par rapport au cristalloïdes [50-53].

1.2.2 Traitements

A) Traitements antimicrobiens

À cause de l'immunosuppression et des infections bactériennes et fongiques chez les patients GB, l'utilisation de substances antimicrobiennes est primordiale. Les antimicrobiens peuvent être donnés d'une façon topique ou systémique.

Les antibiotiques topiques sont employés localement sur les plaies sous forme de pommade afin de contrôler la colonisation bactérienne. Le choix des antibiotiques dépend des espèces bactériennes ciblées et du type d'infection. Les antibiotiques systémiques sont surtout administrés de façon prophylactique chez les patients GB pour éviter les infections systémiques, souvent juste avant une intervention chirurgicale. Toutefois, un traitement prophylactique prolongé risque d'accorder aux pathogènes une résistance plus importante contre les antibiotiques [32, 54].

B) Autres traitements

Les patients brûlés sévèrement, surtout ceux au deuxième degré, éprouvent une douleur intense. Ainsi, les centres de GB ont fréquemment recours aux analgésiques pour contrôler la douleur [26, 55]. De plus, les opioïdes peuvent potentiellement interférer dans le processus de réanimation et déréguler le système cardiovasculaire en réduisant la pression artérielle [17].

Comme vu précédemment, la peroxydation des lipides membranaires et la production accrue de ROS sont observées chez les patients GB, ce qui favorise l'utilisation des antioxydants tels que le glutathione, zinc, le sélénium et les vitamines C et E [17, 20].

Comme mentionné auparavant, les patients GB présentent un hypermétabolisme qui accroît le besoin énergétique, la consommation d'oxygène, la lipolyse, la résistance à l'insuline et la perte de poids. Le Propanolol est un bêta-bloquant utilisé chez les patients GB pour son activité anti-catabolique [26]. Ce médicament inhibe la lipolyse périphérique, fait obstacle à l'accumulation de gras hépatique, stimule la synthèse protéique et réduit la quantité d'insuline nécessaire pour contrôler la glycémie [46]. Il

existe d'autres possibilités comme l'Oxandrolone, un agent anabolique qui permet de contrecarrer les effets de l'hypermétabolisme chez les patients GB [26, 46]. Le soutien nutritionnel est également essentiel pour combler les besoins caloriques des patients. L'alimentation peut être fournie par la voie parentérale (voie intraveineuse) ou par la voie entérale (voie orale) [26]. L'utilisation précoce de l'alimentation par la voie entérale améliore l'état des patients en limitant le catabolisme anormal et réduit la translocation bactérienne [56, 57]. De plus, des études montrent que la voie parentérale peut augmenter les risques d'infections fongiques [58].

1.2.3 Débridement précoce et greffes de peau chez les patients grands brûlés.

Les tissus nécrosés aux sites de brûlures font obstacle à la cicatrisation des plaies et amplifient l'état inflammatoire et les infections chez les patients. Ainsi, les couches de peau morte sont généralement excisées dans les premiers jours suite aux brûlures sévères. Cette procédure de débridement de la peau permet de limiter la colonisation de la plaie, réduire la chance de développer un sepsis et d'avoir une bonne adhérence des greffes de peau. Dans le cas des brûlures du troisième degré, les excisions se font à un niveau aussi profond que les fascias musculaires [59]. Pendant une grande partie du 20ème siècle, les excisions chirurgicales précoces et les greffes n'aboutissaient pas à une amélioration de l'état des patients. Selon la méthode traditionnelle d'avant les années 80, les greffes étaient réalisées après avoir attendu la séparation spontanée des tissus nécrotiques [60]. Or, plus récemment, les améliorations des techniques opératoires et les meilleures connaissances de la pathophysiologie des patients GB ont permis aux excisions chirurgicales précoces de réduire la morbidité et la mortalité des patients [59]. La combinaison de l'excision de la peau brûlée et les thérapies antimicrobiennes ont fait diminuer le nombre de décès dues aux infections [34, 60]. Le raffinement des méthodes d'excisions sont surtout basées sur la minimisation de la perte de sang et de la chute de température corporelle. Notons que seulement 20% du TBSA peut être excisée pour chaque opération de 2 heures au maximum [61, 62].

La fermeture des plaies se fait avec différents types de greffes de peau ou remplacements artificiels. Les greffes procurent une barrière physique pour protéger l'organisme contre les bactéries exogènes et les traumatismes physiques. Les greffes autologues venant de la peau saine du patient GB est la meilleure option. La peau saine, constituée de couches épidermique et dermique, peut être étirée pour couvrir une surface plus grande que le site d'origine [63]. Le plus grand avantage des autogreffes et des isogreffes est la compatibilité qui réduit la chance d'un rejet par le système immunitaire. Cependant, dans les cas de TBSA très élevées, les sites de peaux saines ne sont pas suffisants pour effectuer une greffe autologue. Dans ces situations, l'utilisation de couvertures temporaires des plaies est requise. Les allogreffes biologiques issues de cadavres et préservés dans une banque de peau, sont souvent utilisés dans ces cas. Contrairement aux greffes autologues, les donneurs des allogreffes présentent des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) différents des receveurs, ce qui mène au rejet éventuel du greffon. Toutefois, l'avantage des allogreffes par rapport aux xénogreffes est leur vascularisation qui persiste pendant un certain temps, prolongeant la demi-vie avant le rejet. Il est préférable d'utiliser des allogreffes fraîches, mais celles qui sont congelées peuvent quand même servir de couverture temporaire [62]. Les xénogreffes, souvent issues du derme de porc, sont aussi utilisées de façon temporaire suite à l'excision de la blessure. Les xénogreffes peuvent adhérer et humidifier les sites de brûlures mais de manière temporaire, car elles ne se vascularisent pas et se nécrosent après quelques jours [64]. Dernièrement, les remplacements de peau synthétiques sont aussi une alternative pour couvrir les plaies suite au débridement. Un exemple de matériel synthétique est le Biobrane, un pansement composé d'une membrane de silicone lié à une couche de collagène de type 1 porcine qui favorise l'adhérence, la croissance du réseau de fibrine et l'épithélialisation de la peau brûlée [62, 65]. Il existe d'autres moyens qui impliquent la culture de kératinocytes et de fibroblastes pour former une peau artificielle épidermique et dermique [63].

1.3 Le système immunitaire inné

1.3.1 Qu'est ce qui constitue le système immunitaire inné?

La peau constitue la barrière anatomique à faire obstacle aux pathogènes externes. Suite à la rupture de la peau par le choc thermique, le système immunitaire intervient pour défendre l'organisme face aux microorganismes qui infiltrent les tissus et la circulation sanguine. La réponse immunitaire est constituée de deux composantes. La première phase constitue l'immunité innée, première ligne de défense contre les infections tout de suite après le trauma. Quelques jours après l'insulte, l'immunité adaptative prend le relais de l'immunité innée et permet une réponse efficace à long terme. L'immunité innée est mobilisée suite à la détection de signaux de danger endogènes DAMPs (*Danger-Associated Molecular Patterns*) et exogènes PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Les cellules de l'immunité innée reconnaissent ces signaux avec les récepteurs PRR (*Pattern Recognition Receptors*) [66]. Les leucocytes du système immunitaire inné que nous allons aborder dans ce mémoire sont les monocytes et les macrophages, ainsi que les cytokines et chimiokines majeures qui leur sont associées. Ces deux cellules immunitaires sont des phagocytes qui phagocytent les pathogènes et les digèrent à l'intérieur grâce aux lysosomes en plus de moduler la réponse immunitaire.

Les monocytes et les macrophages sont également des cellules présentatrice d'antigènes (APC ou CPA) et des producteurs de facteurs régulant l'inflammation. Notons que les APC ne font pas partie exclusivement à l'immunité innée vu que les lymphocytes B (LB) de l'immunité adaptative sont aussi des APC. La présentation d'antigènes par l'intermédiaire de complexes majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) permet d'activer d'autres cellules immunitaires, notamment les lymphocytes T (LT) de l'immunité adaptative. Les APC possèdent en plus de molécules de co-stimulation CD80 et CD86 de la famille B7 qui se lient au récepteur CD28 des LT pour permettre leur activation [67]. Ainsi la combinaison des signaux CMH-II:antigène et B7:CD28 engendre plus tard la participation de l'immunité adaptative contre les pathogènes.

La sécrétion de cytokines et chimiokines peut être pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire. Cela signifie que certains facteurs libérés par les monocytes et les

macrophages accentuent la réponse immunitaire contre les microorganismes ou augmentent les dommages tissulaires, tandis que d'autres favorisent l'immunosuppression et la réparation des tissus. Mais il existe d'autres acteurs de l'immunité innée comme les "natural killer cells" (NK), basophiles et éosinophiles que nous n'allons pas aborder en détail.

1.3.2 Les monocytes

Les monocytes sont des cellules immunitaires mononuclées produits initialement dans la moelle osseuse [68]. Les monocytes se déplacent vers la circulation sanguine et se différencient en macrophages et cellules dendritiques dans les tissus après quelques jours [69]. Les monocytes sont subdivisés en trois sous-groupes et sont déterminés selon la co-expression des récepteurs de surface CD14 et CD16. Le premier groupe correspond aux monocytes classiques qui sont CD14⁺ CD16⁻ et sont retrouvés normalement en majorité, soit 80% environ de la population monocyttaire. Le deuxième décrit des monocytes dits non-classiques qui sont CD14^{low} et CD16⁺. Enfin nous retrouvons les monocytes intermédiaires CD14⁺ CD16⁺, définis comme la sous-population transitoire entre les monocytes classiques et non-classiques. Un consortium international soutenu par l'IUIS et le WHO a élaboré la nomenclature de ces trois sous-populations de monocytes [70]. Beaucoup d'études sur les fonctions de chacun des sous-groupes de monocytes présentent des résultats contradictoires.

A) Monocytes classiques

Les monocytes classiques CD14⁺ CD16⁻ sont des phagocytes et des APCs, ainsi que des producteurs de facteurs solubles. Ils produisent une quantité élevée des chimiokines Interleukine-8 (IL-8) et *Chemokine ligand 2* (CCL2) suite à une stimulation par LPS (lipopolysaccharide) [71]. Le LPS est une molécule exprimée sur la surface de bactéries gram négatifs et donc permettent de simuler l'activation de leucocytes face à des bactéries. L'IL-8 (ou CXCL8) produit par les monocytes classiques est une chimiokine dont la fonction est de recruter les neutrophiles du sang vers les tissus [72, 73]. CCL2 (ou

MCP-1: Monocyte chemoattractant protein 1) est aussi une chimiokine qui recrute des monocytes, macrophages, neutrophiles et lymphocytes envers les sites enflammés [74]. Les monocytes classiques secrètent des hauts niveaux d'IL-6, une cytokine à la fois pro-inflammatoire et anti-inflammatoire. Ses actions pro-inflammatoires sont associées à une maturation des LB, activation des LT cytotoxiques, et l'inhibition de l'apoptose des LT [75, 76]. Or IL-6 possède des fonctions anti-inflammatoires en même temps. Elle réduit l'expression de E-sélectine sur les cellules épithéliales et donc inhibe le recrutement de neutrophiles vers les tissus [77]. En plus, des souris IL-6^{-/-} manifestent une inflammation hépatique et une résistance à l'insuline [78]. L'expression de CD36 et CD163, des récepteurs impliqués dans la reconnaissance et la phagocytose de microorganismes [79, 80], est largement supérieur pour les monocytes classiques et intermédiaires par rapport aux monocytes non classiques. Donc les monocytes classiques et intermédiaires ont un pouvoir de phagocytose naturellement élevé [81].

B) Monocytes intermédiaires

Les monocytes intermédiaires partagent les fonctions des deux autres sous-types de monocytes vis à vis la présentation antigénique et la production de facteurs solubles. Parmi les trois sous-populations, les monocytes intermédiaires expriment les plus hauts niveaux des *Toll-Like Receptors* TLR 2, 4 et 5, signalant une capacité à reconnaître les intrus bactérien et à monter une réponse inflammatoire. Il est donc suggéré qu'ils soient les plus sensibles à la stimulation par le LPS et produisent des facteurs pro-inflammatoires comme TNF- α et IL-1 β [71]. Le TNF (*Tumor Necrosis Factor*) est une cytokine pro-inflammatoire avec un effet pléiotropique et précoce affectant la majorité des acteurs du système immunitaire en régulant une multitude de paramètres comme les marqueurs d'activation, la prolifération et la migration [82]. Or son effet répandu affectant multiples organes fait en sorte que le TNF est souvent associé au choc septique [75]. IL-1 β est une cytokine pro-inflammatoire essentielle dans la défense initiale contre les infections et peut activer certaines sous-populations monocytaires et induire la production d'IL-8 [73, 83]. Mais les monocytes sont aussi connus pour leur capacité à produire IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, surtout en présence de cellules apoptotiques [84, 85]. Les actions de l'IL-10 incluent la suppression des LT et la

diminution de la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires. Certaines études démontrent qu'IL-10 est majoritairement produite par les monocytes intermédiaires [81, 86], tandis que d'autres observent une sécrétion plus élevée par les monocytes classiques [71, 87]. Ainsi, il est encore difficile à dire avec toute certitude quel sous-type est le principal producteur de signaux anti-inflammatoires. Néanmoins, les monocytes intermédiaires ont un potentiel anti-inflammatoire. Comme mentionnés ci-dessus, les monocytes intermédiaires possèdent une activité phagocytaire plus élevée par rapport aux monocytes non-classiques. Les études sur la présentation antigénique des monocytes intermédiaires sont contradictoires. Certaines montrent que la population intermédiaire manifeste une capacité de présentation d'antigène inférieure aux autres sous-types [86]. Or d'autres études contraires montrent que l'expression de CMH de type II est la plus élevée chez les monocytes intermédiaires, suggérant qu'ils sont les meilleurs APC et stimulateurs des LT [88].

C) Monocytes non-classiques

Le monocyte non-classique est la forme la plus mature parmi les trois sous-types. Les monocytes non-classiques sont dans un état antiprolifératif [89], et expriment fortement des inhibiteurs du cycle cellulaire comme CDKN1C [88]. Plusieurs études ont suggéré que la population non-classique est en effet l'état le plus différencié [88, 90]. Des études ont aussi démontré la faible activité phagocytaire des monocytes non-classiques. Cependant, la majorité des observations indiquent que cette sous-population secrète les plus hauts niveaux des médiateurs pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β et le CCL3 [71, 81, 88]. Or encore une fois, certaines études contredisent ces observations en montrant que TNF- α et IL-1 β sont surtout produits par les monocytes classiques et intermédiaires et que faiblement par les non-classiques [91]. Contrairement aux monocytes intermédiaires et classiques, les non-classiques ne produisent pas d'IL-10 et donc sont supposément des acteurs plutôt pro-inflammatoires [86].

Beaucoup d'études présentent des observations contradictoires sur les sous-types de monocytes. Ces contradictions sont en partie dues à des différences de méthodologie et de stratégies de "gating" en cytométrie en flux. Notons qu'il serait inexact de définir

certaines populations de monocytes comme exclusivement pro-inflammatoires ou exclusivement anti-inflammatoires. La fonction est très dépendante de la situation inflammatoire, du contexte pathologique et le microenvironnement qui entourent les monocytes.

1.3.3 Les macrophages

Les monocytes circulants, lorsque activés par divers stimuli, transmigrent dans le tissu et se différencient en macrophages. Le macrophage est un phagocyte primordial dans la réponse immunitaire innée face aux insultes inflammatoires et aux infections. La phagocytose des envahisseurs externes, de débris cellulaires et des cellules mortes constitue la fonction primaire des macrophages. Toutefois, comme les monocytes, les macrophages jouent également un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire par l'intermédiaire de cytokines et chimiokines. Selon la circonstance et des cytokines du microenvironnement en question, les monocytes peuvent se polariser en macrophages classiques nommés M1 ou en macrophages alternatifs appelés M2. Les macrophages M1 ayant des fonctions antimicrobiennes, contribuent surtout à la clairance des pathogènes et la destruction tissulaire. C'est ainsi que les M1 favorisent un environnement pro-inflammatoire. Par contre, la tâche des macrophages M2 est de promouvoir la réparation des tissus, l'angiogenèse et la cicatrisation des plaies [92, 93]. Pour ce faire, les M2 génèrent des signaux anti-inflammatoires favorisant un état immunosuppresseur [75]. Par conséquent, la sécrétion des facteurs solubles varie selon la polarisation en macrophages M1 ou M2. Il existe plusieurs sous-types de macrophages comme les M2a, M2b et M2c qui ne seront pas abordés dans le contexte de ce mémoire [94].

A) Macrophage M1

La polarisation en macrophages M1 pro-inflammatoires implique une exposition des monocytes aux stimuli tels DAMP/PAMP, LPS, TNF, IFN- γ et GM-CSF [75, 95]. Comme les monocytes, les macrophages M1 sont capables de synthétiser les cytokines pro-inflammatoires TNF, IL-1 β et IL-6 [75, 96]. Le processus de phagocytose et la

sécrétion de TNF par les macrophages se font simultanément. En fait, les macrophages économisent le transport et l'exocytose membranaire pour phagocyter des pathogènes et libérer TNF en même temps [97, 98]. Les macrophages M1 secrètent d'autres médiateurs pro-inflammatoires tels qu'IL-12 [75, 96]. L'IL-12 stimule la différenciation des LT naïfs, la production d'IFN- γ et la cytotoxicité des LT et les NK [75, 99]. Les macrophages M1 libèrent entre autres les chimiokines suivantes: CCL2, CCL5 (RANTES) et CCL8 (IL-8). Ces molécules jouent un rôle important dans le recrutement de divers leucocytes au site d'inflammation, en particulier les LT, les neutrophiles et les monocytes [75, 100-103]. En outre, des études montrent bien que les macrophages M1 expriment fortement CMH-II, ce qui les rend des APC efficaces [92]. La molécule de co-stimulation CD80 est spécifique aux macrophages M1 et donc permet de les discerner des M2 [104].

B) Macrophage M2

La formation des macrophages M2 est induite par différentes combinaisons d'IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) et glucocorticoïdes [75, 95, 105]. Les molécules de surface CD206 (ou récepteur du mannose), CD23 (ou Fc ϵ R2) et CD163 sont suggérés être des marqueurs des macrophages M2 [93, 94, 106]. Comme certains sous-types de monocytes, les macrophages M2 secrètent la cytokine anti-inflammatoire IL-10 qui a un effet autorégulateur sur les macrophages eux-mêmes [94]. L'IL-10 atténue l'activation des macrophages M1 microbicides et par conséquent réduit la production des protéines pro-inflammatoires TNF, IL-1 β , IL-6 et IL-12 [107, 108]. En outre, l'IL-10 réduit l'expression de CMH-II des macrophages et donc inhibe leur fonction d'APC [109]. Les macrophages traités par IL-10 phagocytent davantage les cellules apoptotiques et produisent le "B cells activating factor of the TNF family" / "B lymphocyte stimulator" (BAFF/BLyS) [110]. Comme son nom l'indique, BAFF fait partie de la famille des TNF et est exprimé par les monocytes, macrophages et DC. BAFF est impliqué dans la prolifération, la différenciation et la survie des LB entre autres. En tandem avec l'IL-10, les macrophages M2 secrètent TGF- β , une autre cytokine anti-inflammatoire qui inhibe la production de médiateurs inflammatoires et favorise l'activité des LT régulateurs (Tregs) [75, 111]. Les macrophages M2 incitent aussi l'angiogenèse via leur production de VEGF (Vascular endothelial Growth Factor), une molécule impliquée dans la

formation de vaisseaux sanguins ainsi que la prolifération et la survie des cellules épithéliales [92, 93]. Ce processus assisté par les macrophages M2 est essentiel pour la réparation des tissus et la fermeture des plaies. Les macrophages activés, ainsi que les cellules endothéliales et épithéliales apoptotiques libèrent la molécule MFG-E8 (*Milk fat globule epidermal growth factor-8*), aussi appelé lactadhérine [93, 112]. MFG-E8 est une protéine anti-inflammatoire qui entraîne la polarisation des macrophages en M2, la phagocytose des cellules apoptotiques, l'angiogenèse et la fermeture des plaies [93, 113].

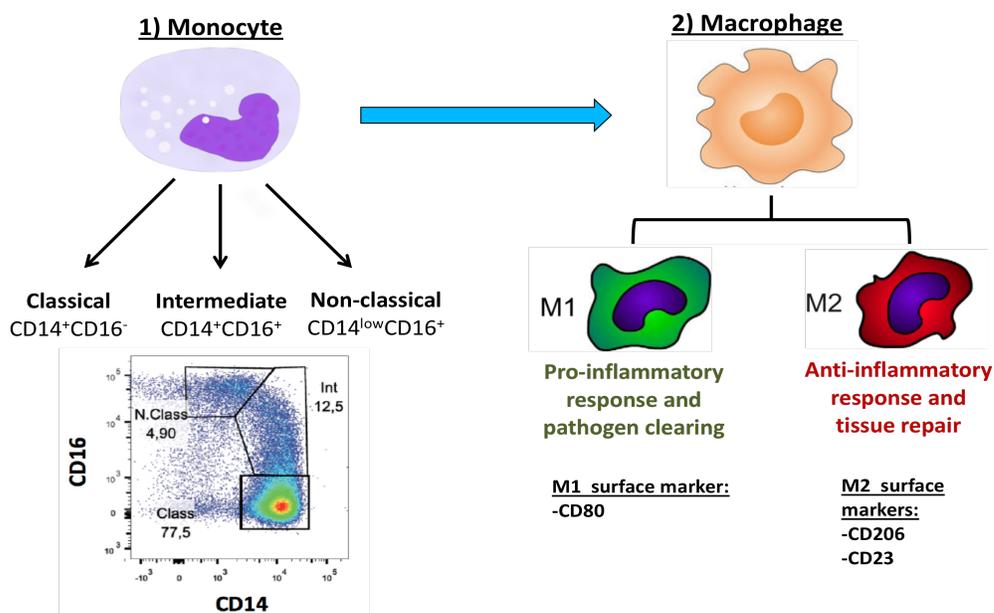


Figure 3. Représentation des sous-types de monocytes et des macrophages M1 et M2.

1.3.4 Les cellules myéloïdes suppressives

Les MDSC (Cellules myéloïdes suppressives ou *myeloid-derived suppressor cells*) sont des cellules immatures immunosuppressives impliquées dans plusieurs pathologies dont le cancer, les brûlures et le sepsis [114, 115]. Les MDSC constituent des populations hétérogènes. Elles peuvent être mononucléaires comme les MDSC monocytaires ou bien polynucléaires comme les MDSC granulocytaires [114]. Les MDSC utilisent plusieurs mécanismes pour induire l'immunosuppression des lymphocytes T en particulier [116]. Par exemple, les MDSC produisent l'enzyme arginase qui métabolise l'acide aminé L-

arginine. L'épuisement de L-arginine réduit l'expression des molécules de signalisation comme le CD3 ζ de surface qui est indispensable à la prolifération des lymphocytes T [116, 117]. Les MDSC exercent leurs fonctions régulatrices également via l'oxyde nitrique (NO), les ROS, les prostaglandines E2 et le TGF- β pour réprimer l'activation des lymphocytes T [114, 118]. Ainsi, les MDSC sont des cibles d'intérêt dans l'immunothérapie contre le cancer et les maladies infectieuses [119, 120].

1.4 Le système immunitaire adaptatif

1.4.1 L'activation de la réponse adaptative par les cellules dendritiques

Alors que le système immunitaire inné déclenche une réponse générale et immédiate, le système immunitaire adaptatif entraîne une réponse tardive et spécifique. Contrairement à l'immunité innée, l'immunité adaptative requiert 4 à 7 jours avant d'effectuer ses fonctions. L'avantage ultime du système adaptative est son ciblage spécifique contre les pathogènes et sa capacité à se rappeler des agresseurs étrangers. Cette mémoire immunitaire permet de reconnaître l'antigène subséquent et d'agir beaucoup plus rapidement et efficacement afin de l'éliminer.

Les cellules dendritiques (DC) sont des APC professionnelles qui forment le pont entre la réponse innée et la réponse adaptative. Les DC peuvent se trouver dans les tissus ou dans le sang dans une forme immature [121]. Comme les monocytes et les macrophages, les DC reconnaissent les pathogènes via les récepteurs PRR et TLR pour ensuite les phagocyter et présenter l'antigène avec le CMH-II [122-124]. Ce contact avec le pathogène induit l'activation et la maturation des DC afin d'exprimer les molécules accessoires comme CD80/CD86 (B7) qui sont essentielles pour la fonction des APC [125]. Les DC matures migrent vers les ganglions lymphatiques et rentrent en contact avec les deux acteurs principaux du système immunitaire adaptatif: le lymphocyte T (LT) et le lymphocyte B (LB). Les DC présentent le fragment antigénique aux LT et LB naïfs

pour les activer et pour déclencher une réponse immunitaire spécifique contre le pathogène d'intérêt [121, 126].

Le LT exécute une immunité à médiation cellulaire, tandis que le LB déclenche une immunité humorale mettant en action des anticorps. Chacun de ces lymphocytes sont hétérogènes et donc peuvent adopter différentes formes et rôles.

1.4.3 Les lymphocytes T

Les cellules progénitrices sont produites dans la moelle osseuse et se différencient en LT naïves au niveau du thymus. Ensuite, la maturation des LT suite au contact d'un antigène a lieu au niveau de la circulation lymphatique et les ganglions lymphatiques. Les LT expriment un récepteur unique nommé le T Cell Receptor (TCR). Le TCR est constitué d'une chaîne α et d'une chaîne β , ou d'une chaîne γ et d'une chaîne δ . Le TCR de surface reconnaît deux éléments lors du contact avec les APC: le CMH et l'antigène présenté par ce CMH. Le TCR est lié au co-récepteur de surface CD3 qui, suite au contact avec l'antigène, déclenche la signalisation intracellulaire menant à l'activation du LT. Par ailleurs, la présence de molécules accessoires comme le CD28 qui se lie aux molécules de co-stimulation CD80/CD86 (B7) des APC, permet d'amplifier l'activation du LT [67, 127].

L'activation des LT CD4⁺ induit l'expression de CD40 ligand (CD40L/CD154/ gp39), une protéine appartenant à la famille des TNF et qui influence la biologie des APC. Le CD40L peut être exprimé sur la surface des LT activés ou peut se trouver sous forme soluble (sCD40L). Le CD40L se lie au récepteur CD40 exprimé constitutivement chez les APC [67]. Une des fonctions principales de CD40L est la communication entre les LT et les LB. La liaison de CD40L au CD40 stimule fortement la maturation, la prolifération et la survie des LB. Dans ce dessin, les LT sont aussi impliqués dans l'initiation de l'immunité humorale [128]. En fait, le CD40L active aussi les fonctions effectrices des APC comme les monocytes, les macrophages et les DC. Plusieurs études sur des cellules humaines et murines démontrent l'activation des APC par le signal CD40-CD40L. Par

exemple, le CD40L stimule la production de TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-8 par les monocytes [129], ainsi que la production de TNF- α et oxyde nitrique par les macrophages [130, 131]. Particulièrement, le CD40L fait augmenter la sécrétion d'IL-12 par les monocytes, les macrophages et les DC, une cytokine indispensable à l'activation des LT [128, 132-135]. Le CD40L présente également des effets sur la maturation des DC en augmentant leur expression de CMH-II [136]. De plus, le CD40L accroît davantage le pouvoir de présentation d'antigènes en augmentant l'expression des molécules de co-stimulation B7 des APC [67, 128, 137, 138]. Étant donné que les LB naïfs ne présentent pas autant de molécules de co-stimulation que les autres APC, la stimulation par le CD40L rend les LB des APC compétents [134, 138]. Ainsi, il s'agit d'un circuit de rétroaction positive où le CD40L amplifie le signal B7-CD28 et en retour active les LT encore plus et induit une plus grande production de CD40L. D'ailleurs, la participation primordiale du CD40L dans les interactions immunologiques le rend une cible thérapeutique de choix dans le cas des maladies auto-immunes et des rejets de greffes [137].

Les LT peuvent adopter différentes formes et entreprendre différentes fonctions. Les trois types de LT abordés brièvement ici sont : les cellules T auxiliaires CD4⁺ ou "T helper cells" (Th), les LT régulateurs (Tregs), et les LT cytotoxiques CD8⁺.

Les cellules Th CD4⁺ ont pour fonction principale la sécrétion de cytokines qui régulent la prolifération et la différenciation de plusieurs leucocytes incluant les LB, macrophages et LT eux-mêmes. Ils existent différents sous-types de LT CD4⁺ qui produisent différentes cytokines et engendrent donc des réponses distinctes. Parmi ces sous-types sont le Th1 et Th2. Les Th1 sont mis en action en présence des bactéries et virus intracellulaires et favorisent une réponse à médiation cellulaire. Ils secrètent IFN- γ , TNF- β et IL-2 [139, 140]. IFN- γ stimule les fonctions phagocytaires et antibactériennes des macrophages qui permettent d'éliminer les infections intracellulaires. La combinaison d'IFN- γ et IL-12 favorise la polarisation en Th1 dans un effet de boucle autocrine [141]. L'IL-2 produit par les Th1 est un facteur de croissance essentiel à l'expansion clonale, la différenciation et la survie des LT [142, 143]. Or, des études plus récentes illustrent une image plus complexe d'IL-2 qui semble induire la formation de LT régulateurs (Tregs) et donc contribue non seulement à la réponse immunitaire, mais aussi à l'auto-régulation

[142, 144]. D'une autre part, les Th2 servent de défense contre les parasites extracellulaires en favorisant l'immunité humorale médiée principalement par les LB [145]. Ils produisent IL-4, IL-6, IL-10 et IL-13. [139, 140] L'IL-4 et IL-6 agissent d'une manière autocrine et induisent davantage la différenciation des LT naïfs en Th2 [141]. L'IL-4 et IL-13 relâchées par les Th2 stimulent la production d'immunoglobulines E (IgE) et G (IgG) par les LB [140, 146]. L'IL-10 inhibe la différenciation en Th1 et limite donc la production d'IFN- γ qui s'oppose à la réponse de type 2. À part les Th1 et Th2, il existe d'autres types de LT CD4⁺ comme les Th17 qui secrètent l'IL-17, une cytokine inflammatoire agissant sur les cellules stromales et menant au recrutement des neutrophiles [147]. Les LT peuvent aussi se différencier en Th22, un sous-type qui produit particulièrement l'IL-22 agissant en synergie avec l'action des Th17 [148, 149]. Un autre sous-type est le Th9 caractérisé par sa production d'IL-9, un facteur de croissance pour les leucocytes qui est impliqué dans la réponse immunitaire contre les helminthes [150, 151].

Les Tregs (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) jouent un rôle immunosuppresseur crucial dans la prévention de l'inflammation chronique et des maladies auto-immunes. Suite aux réponses contre les infections, les Tregs préviennent les dommages des tissus du soi en rétablissant l'homéostasie inflammatoire [152]. Pour ce faire, les Tregs répriment les fonctions et la prolifération des LT effecteurs et des APC en sécrétant les cytokines immunosuppressives IL-10, IL-35 et TGF- β [152-156]. Les Tregs expriment CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*), un récepteur membranaire qui se lie aux molécules de co-stimulation B7 des APC et donc rentre en compétition directe avec CD28 des LT [153, 154]. Les Tregs, via l'interaction cellulaire de CTLA-4 / B7, empêchent la présentation de l'antigène et l'activation des LT. En outre, les Tregs peuvent induire l'apoptose des LT auto-réactifs par l'intermédiaire des granzymes [153, 157].

Les LT CD8⁺, dites cytotoxiques (Tc), sont des cellules immunitaires indispensables dans la lutte contre les microorganismes intracellulaires. La fonction principale des Tc est la destruction des cellules servant d'hôtes pour les parasites internes tels que les virus et les bactéries cytoplasmiques. Les Tc reconnaissent le CMH de classe I (CMH-I) sur la surface des cellules [158, 159]. Un CMH-I présentant un antigène, signale les Tc que la cellule en question est infectée. La reconnaissance du CMH-I permet une action

spécifique des Tc contre les cellules infectés et minimise les dommages aux tissus sains. Suite à cette reconnaissance, les Tc libèrent des granules contenant des molécules lytiques nommés les perforines et les granzymes [159]. Les perforines s'insèrent dans la membrane cellulaire pour former des pores permettant l'entrée des granzymes dans la cellule infectée. Les granzymes sont des protéases qui dégradent les protéines intracellulaires et déclenchent la mort programmée de la cellule cible [158]. Ainsi les Tc jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la multiplication des pathogènes à l'intérieur des cellules infectés.

1.4.4 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B (LB) sont les principaux acteurs de l'immunité humorale en produisant les anticorps. Ils produisent diverses immunoglobulines (Ig) qui neutralisent les microorganismes étrangers et permettent le phénomène d'opsonisation. L'opsonisation correspond à la liaison des anticorps aux pathogènes facilitant leur ingestion par les phagocytes et ceci est essentiel au contrôle des infections bactériennes.

Les progéniteurs des LB sont générés dans la moelle osseuse et suivent différents étapes de différenciation et de sélection pour donner des LB immatures naïfs [160, 161]. Les LB naïfs de la moelle osseuse sont transférés dans la circulation, puis ensuite dans les organes lymphoïdes secondaires, dont la rate et les ganglions lymphatiques. Les organes lymphoïdes secondaires permettent des étapes de différenciations subséquentes dans des microenvironnements spécialisés appelés les centres germinaux (GC) [162]. À ce niveau, les LB deviennent tout d'abord matures naïfs. Le terme "naïfs" indique que les LB ne sont pas encore entrés en contact avec l'antigène et n'ont pas été activés. Les "B cell receptors" (BCR) sont constitués d'Ig transmembranaires naïves et leur expression varie au cours du développement des LB [163]. Les LB matures naïfs expriment IgM et IgD sur leur surface [161, 164]. La molécule IgD, un anticorps monomérique, est impliquée dans la signalisation responsable de l'activation des LB [165]. Les LB non activés sont IgD⁺ tandis que les LB les plus différenciés sont IgD⁻. Au niveau des GC, les LB naïfs reconnaissent des antigènes avec le BCR et les internalisent par endocytose pour les digérer. Comme les monocytes et les macrophages, les LB sont des APC professionnelles

qui présentent par la suite les peptides aux LT via CMH-II [163]. Comme vu précédemment, cette action stimule la maturation des LT en Th et induit l'expression de CD40L trimérique, ainsi que les cytokines IL-4 et IL-21 [166]. Le CD40L se lie au récepteur CD40 exprimé constitutivement chez les LB afin de déclencher leur activation [134, 161, 167]. Cette interaction, en combinaison avec les effets d'IL-4 et IL-21 liés à leur récepteurs, entraînent une prolifération intense des LB par expansion clonale [168]. Cette activation engendre également l'hypermutation somatique et la commutation de classe des Ig, des processus d'adaptation permettant de modifier l'isotype des Ig afin de maximiser leur spécificité et affinité aux pathogènes. L'activation des LB les pousse aux dernières étapes de différenciation vers des plasmocytes ou des LB mémoires [162, 168]. Les plasmocytes sont des LB effecteurs qui produisent une grande quantité d'anticorps solubles en périphérie pour combattre les infections extracellulaires. Les LB mémoires rendent possible une réponse humorale accélérée et amplifiée lors d'une réexposition aux mêmes pathogènes. Ainsi, les Ig de surface des LB mémoires ont tendance à avoir la plus haute affinité contre leurs antigènes.

La commutation isotypique permet aux plasmocytes de changer la région constante des Ig pour sécréter IgG, IgA et IgE [161]. IgM est un pentamère et est souvent le premier anticorps à être déployé contre les infections aiguës [169]. Or contrairement aux autres immunoglobulines, IgM est incapable de se déplacer de la circulation vers les tissus infectés à cause de sa taille. IgG et IgE étant monomériques et IgA étant mono/dimérique, ils peuvent passer à travers les vaisseaux sanguins pour se rendre aux tissus infectés [164]. IgG est l'anticorps le plus abondant en périphérie, soit 75% des Ig totaux circulants, et est subdivisé en quatre sous-types. IgG1 et IgG3 sont particulièrement puissants contre les virus alors qu'IgG2 est surtout efficace contre les bactéries encapsulées et IgG4 contre les invasions parasitaires [164, 170]. IgA a deux sous-classes (IgA1 et IgA2) et est généralement le plus abondant dans les sécrétions des muqueuses. Les couches muqueuses correspondent à des portes d'entrée majeures des pathogènes et donc IgA joue un rôle important contre l'intrusion bactérienne à ce niveau [171]. IgE est impliqué dans les réactions contre les parasites extracellulaires tels que les helminthes et dans l'hypersensibilité de type 1 lors des réactions allergiques [172].

Alors que les relations entre les LB et les LT sont relativement bien caractérisées, ils existent aussi des interactions entre les LB et les monocytes/macrophages qui sont moins définies. Plusieurs études ont démontré la capacité des LB à proliférer et se différencier indépendamment des LT et du signal CD40 [173, 174].

La protéine BAFF (B cell activating factor) mentionnée auparavant, est un membre de la famille des TNF associée à l'homéostasie des LB. BAFF est produit essentiellement par les monocytes, macrophages et DC suite à leur stimulation par IFN- γ et dans une moindre mesure l'IL-10 [175-177]. BAFF se trouve sous forme transmembranaire ou soluble [174], et se lie à trois récepteurs sur la surface des LB: BCMA (B-cell maturation antigen), TACI (transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor) et BAFF-R (BAFF receptor) [175, 178]. La survie, la prolifération et la maturation des LB sont substantiellement influencées par l'effet de BAFF [174, 176, 179]. En fait, BAFF peut prévenir l'apoptose des LB en inhibant les signaux pro-apoptotiques et en stimulant les facteurs de survie comme l'oncoprotéine Bcl-2 [175, 180, 181]. Des études confirment que BAFF conduit à la formation de plasmocytes et à l'augmentation de la concentration d'Ig dans le sérum [176-178].

1.5 Modifications du système immunitaire chez les patients grands brûlés.

1.5.1 L'immunité innée chez les patients grands brûlés

A) Syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS)

La première ligne de défense, le système immunitaire inné, est drastiquement altéré chez les patients GB.

Des études sur les patients GB montrent l'augmentation de la concentration de TNF- α qui fait partie de la première vague de signaux pro-inflammatoire suite au choc thermique [182-185]. En revanche, d'autres études, montrent une faible concentration de TNF- α

[186, 187]. Il est possible qu'une augmentation des récepteurs TNFR I et II solubles qui, en se liant à leur ligand, pourraient expliquer pourquoi le TNF- α libre n'est pas parfois détecté en circulation [188].

Selon certaines études, la concentration d'IL-1 β augmente considérablement post-brûlures [187, 189, 190]. Comme TNF- α , IL-1 β appartient à la première vague de signaux inflammatoire reflétant la phase initiale d'hyperactivation du système immunitaire.

Beaucoup d'études indiquent une augmentation des niveaux d'IL-6 sérique en corrélation avec la sévérité des brûlures chez les patients [76, 183, 186, 191-193]. L'IL-6 est exprimée par divers globules blancs incluant les monocytes, macrophages, LT et LB. Sa hausse dramatique chez les patients GB contribue fortement à la réaction inflammatoire aiguë et la fièvre [76].

L'IL-8, sécrétée notamment par les monocytes et les macrophages entre autres, est fortement produite chez les patients GB. Cette hausse d'IL-8 engendre une augmentation de la phagocytose et le recrutement des neutrophiles aux sites inflammatoires [76, 194]. Plusieurs études démontrent la dérégulation des fonctions des neutrophiles chez les patients GB, dont leur motilité et leur capacité à phagocyter et tuer les bactéries [29, 37, 195-199]. Plus précisément, les neutrophiles sont activés dans les phases initiales post-brûlures et deviennent compromis plus tardivement, ouvrant la porte aux infections [200].

Étant donné que TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-8 sont en grande partie produits par les monocytes et les macrophages, ces observations suggèrent une activation de ces leucocytes post-brûlures [201, 202]. La prédominance initiale de ces médiateurs pro-inflammatoires est non seulement observée systématiquement, mais aussi localement dans le microenvironnement des plaies brûlées [203]. Cette cascade inflammatoire médiée par les monocytes et les macrophages pourrait contribuer aux dommages tissulaires et initier par la suite la production de signaux anti-inflammatoires compensatoires qui mènent à l'immunosuppression [202]. Cependant, aucune étude n'a évalué le phénotype des monocytes et des macrophages chez les patients GB. De plus, il

reste toujours inconnu si l'environnement immun des patients GB favorise la formation des macrophages M1 ou des macrophages M2.

B) Syndrome de réponse anti-inflammatoire compensatoire

Plusieurs études révèlent une augmentation de signaux anti-inflammatoires comme l'IL-10. L'IL-10 augmente initialement juste après la brûlure et diminue ensuite après quelques jours [76]. Cependant, certains patients GB septiques présentent des niveaux d'IL-10 continuellement élevés [204]. L'IL-10 serait associée à l'immunosuppression et à un risque accru d'infections [76, 204-206]. Sachant le rôle d'IL-10 dans la désactivation de certains sous-types de macrophages et de LT ainsi que la réduction des médiateurs pro-inflammatoires, cette cytokine immunosuppressive est une cible d'intérêt chez les patients GB.

Comme vu précédemment, les macrophages M2 produisent du VEGF responsable de l'angiogenèse et la réparation des tissus. La littérature montre des niveaux maximaux de VEGF 14 jours après l'admission des patients GB aux soins intensifs [207, 208]. Le VEGF augmente la perméabilité des vaisseaux sanguins et peut donc participer à la formation d'œdème, un problème déjà prévalent chez les patients GB [207, 209]. Toutefois, aucune étude n'a évalué si cette augmentation de VEGF est véritablement associée aux macrophages M2 post-brûlure.

L'expression de CMH II (HLA-DR) sur les PBMC (cellules mononuclées du sang périphérique) est nettement réduite chez les patients GB et les patients septiques [184, 210, 211]. Cette immunosuppression suggère une diminution des capacités des APC à présenter les antigènes aux LT. L'absence d'une telle fonction entrave la coopération entre l'immunité innée et l'immunité acquise, ainsi que l'activation des cellules effectrices. Des cultures de kératinocytes issus de peaux adjacentes aux brûlures montrent aussi une diminution de l'expression de CMH-I et de la molécule co-stimulatrice CD86 [212]. Ces observations indiquent une incapacité des kératinocytes à communiquer la présence d'infections intracellulaires au système immunitaire. En effet, les cellules mononucléaires incluant les monocytes et les macrophages présentent une diminution du chimiotactisme vers les tissus infectés proportionnellement au % TBSA [213].

1.5.2 L'immunité adaptative chez les patients GB

A) Les lymphocytes T chez les patients GB

Un grand nombre d'études sur des patients et des modèles expérimentaux mettent en évidence une lymphopénie suite aux brûlures [214-216]. Cette déplétion de lymphocytes est associée à une production aberrante de facteurs de croissance, ainsi qu'une hausse de cellules avec des fonctions suppressives.

La concentration d'IL-2 produite par les Th1 est à la hausse dans la phase aigüe de l'inflammation [76]. Or, la production d'IL-2 est ensuite sévèrement déprimée durant l'immunosuppression [217-220]. Cette diminution d'IL-2 est associée à une activité et prolifération altérées des LT, conduisant donc à un affaiblissement de l'immunité cellulaire chez les patients GB [221, 222]. De plus, la production d'IFN- γ par les LT est réduite chez les patients GB, entraînant la suppression des macrophages M1 [221].

Comme décrit précédemment, les Tregs présentent des fonctions inhibitrices et peuvent empêcher l'activation des LT Th1 et Th2. Des études ont observé une activation des Tregs (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) chez les patients GB. Ainsi, les Tregs participent possiblement à l'immunosuppression et le sepsis touchant les patients GB [223-226].

B) L'immunité humorale par les lymphocytes B chez les patients GB

Les patients GB présentent un dérèglement majeur du système immunitaire humoral. Un grand nombre d'études sur des patients adultes et pédiatriques montrent une diminution importante de la production d'Ig circulants, qui est généralement regagnée à partir de la deuxième semaine post-brûlures [222, 227-231]. Comme mentionné précédemment, l'IL-6 sérique augmente radicalement chez les patients GB. Malgré l'effet stimulateur d'IL-6 sur la différenciation des LB, la production d'Ig reste basse durant la première semaine. Ainsi, la défaillance de la réponse humorale réduit la défense des patients contre les infections. Cependant, aucune étude n'a investigué la différenciation des LB et ses signaux activateurs comme le sCD40L et l'IL-7 chez les patients GB.

1.6 Résultats antérieurs

1.6.1 Altérations des APC lors de l'activation inflammatoire chez les patients GB

Notre laboratoire a fait des études d'immunomonitoring complètes et a observé des modulations similaires des cytokines inflammatoires. Cependant, d'autres facteurs solubles liés aux APC, ainsi que le phénotype des leucocytes ne sont pas documenté chez les patients GB. Notre laboratoire a observé une augmentation significative du pourcentage de monocytes non-classiques (voir figure 4A ci-dessous). Ces observations concordent avec les études qui montrent aussi une hausse des monocytes non-classiques dans les pathologies inflammatoires et infectieuses comme le sepsis [70, 81, 88]. Comme discuté précédemment, le monocyte non-classique correspond à la forme la plus différenciée et produit les médiateurs pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β et CCL3. Ainsi, il pourrait s'agir d'une activation des monocytes qui contribuerait au SIRS suivant la brûlure.

Notre laboratoire a observé une augmentation significative des MDSC d'origine monocyttaire chez les patients GB (voir figure 4A ci-dessous). Les MDSC sont des cellules immunosuppressives et elles inhibent l'activité des LT notamment. Les MDSC sont souvent associées au sepsis et aux infections bactériennes [232-234] et peuvent donc jouer un rôle important chez les patients GB.

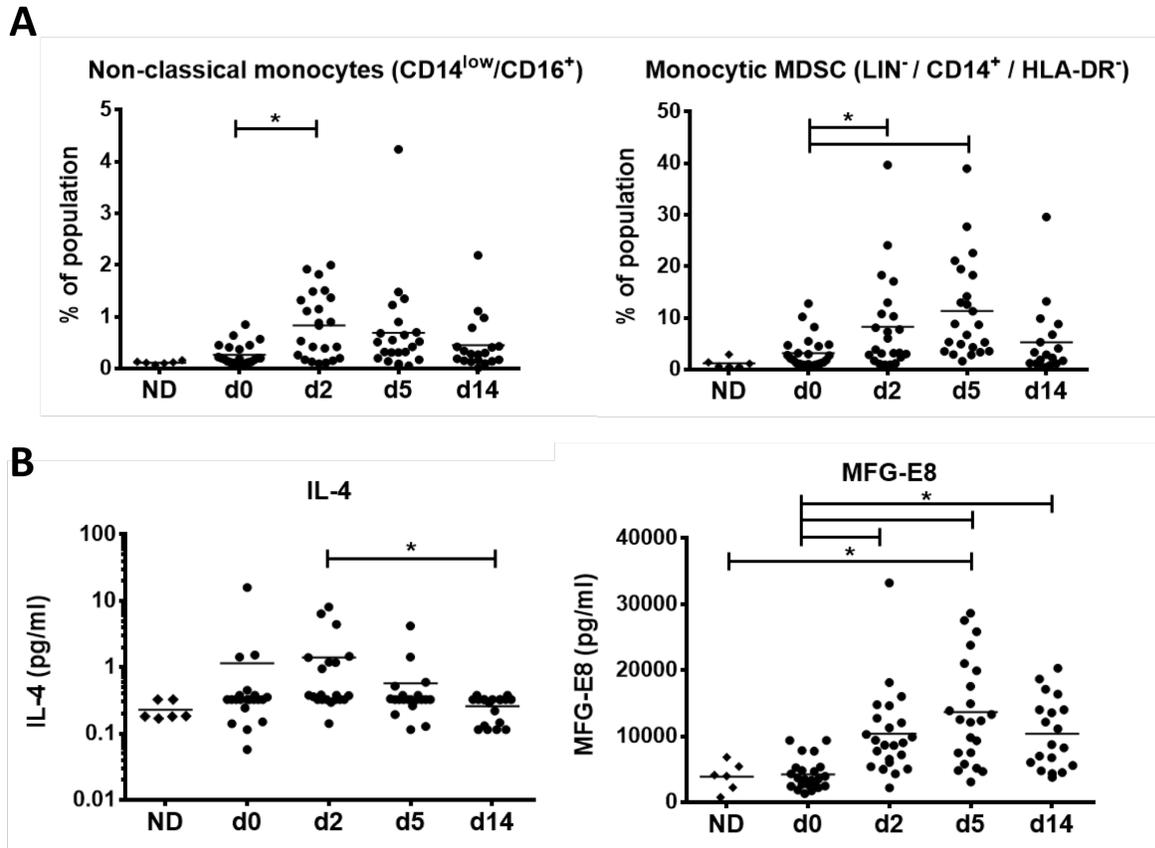


Figure 4. Résultats antérieurs du laboratoire présentant l'altération des populations monocytaires et des signaux anti-inflammatoires affectant la biologie des macrophages en périphérie chez les patients GB. **A.** Proportion de monocytes non-classiques et des MDSC monocytaires chez les patients GB. **B.** Niveaux d'IL-4 et MFG-E8 chez les patients GB. ND: Donneurs normaux.

Notre laboratoire a également observé une augmentation considérable de MFG-E8 et IL-4 durant la première semaine post-brûlure (voir figure 4B). Comme mentionné auparavant, MFG-E8 et IL-4 présentent des actions anti-inflammatoires qui favorisent la polarisation des macrophages vers le phénotype M2 immunosuppresseur. Ainsi ces deux facteurs en circulation peuvent possiblement faire partie de la réponse compensatoire face à la cascade pro-inflammatoire initiale.

Notre laboratoire a observé une chute drastique de sCD40L circulant post-brûlure et sa concentration commence à se normaliser deux semaines suivant aux brûlures (voir figure 5A). Le CD40L joue un rôle primordial dans la prolifération et la maturation des LB. Nous avons aussi observé une augmentation tardive d'IL-7, un stimulateur de la prolifération des LT et LB et un régulateur important des LT mémoires [235]. Cette

augmentation d'IL-7 sérique deux semaines post-brûlures est associée à une activation tardive des LT effecteurs et mémoires chez les patients GB.

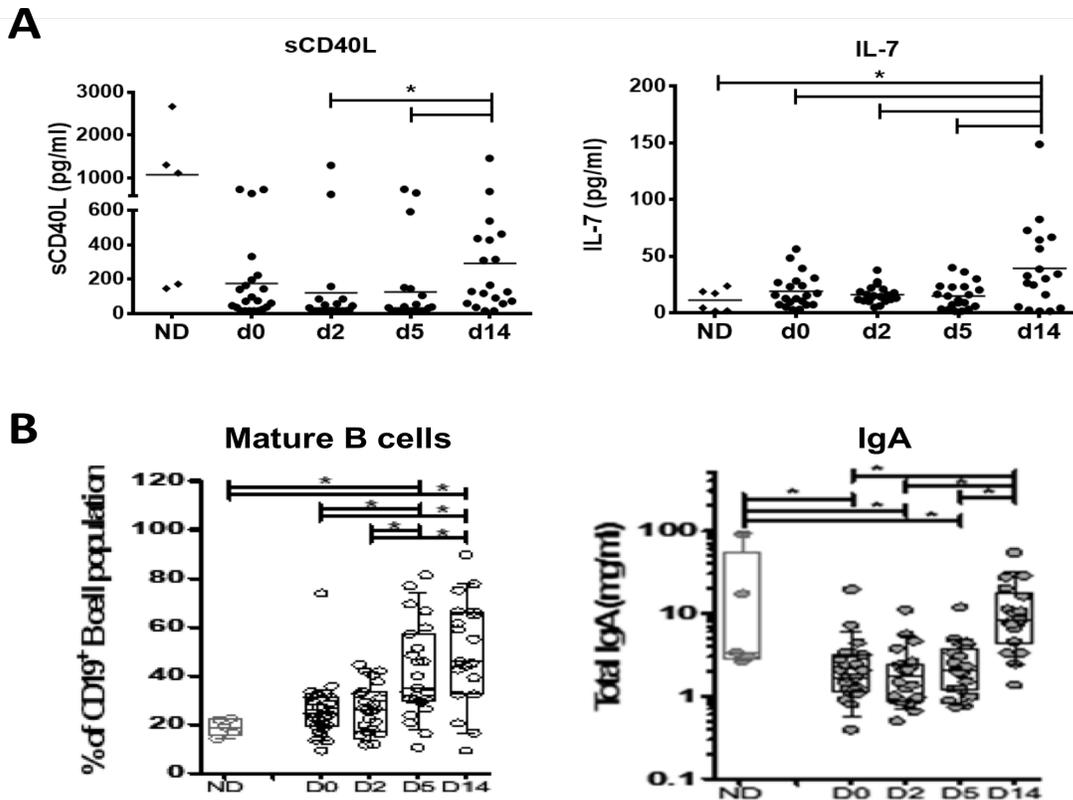


Figure 5. Résultats antérieurs du laboratoire présentant la modulation des signaux affectant la biologie des lymphocytes et l'altération des fonctions des LB dans le sang/plasma des patients GB. A. Niveaux de sCD40L et d'IL-7 chez les patients GB. B. Niveaux des LB matures et d'IgA circulant chez les patients GB. ND: Donneurs normaux.

En effet, nos études démontrent aussi une différenciation tardive des LB, soit deux semaines post-brûlures. Cette différenciation tardive se manifeste par une diminution des LB IgD⁺ naïves et une montée des LB IgD⁻ matures 14 jours post-brûlures. Cette maturation attardée est associée à une élévation tardive des niveaux de sCD40L et d'IL-7. Ce phénomène est possiblement dû à la faible concentration de sCD40L précocement et donc au manque d'activation des LB par la voie du récepteur CD40. La maturation anormale des LB concorde parallèlement avec la diminution des niveaux d'IgA, IgG et IgM que nous avons observé. Nos études démontrent une réduction significative des

concentrations sériques de ces anticorps post-brûlures (seulement IgA est représenté dans la figure 5). Les niveaux d'Ig reviennent à la normale deux semaines post-brûlures.

1.6.2 Récapitulatif des modulations immunologiques chez les patients GB

Les brûlures déclenchent initialement un état de SIRS impliquant une sur-activation des monocytes et macrophages qui secrètent les médiateurs pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-8. Cette cascade inflammatoire initie une réponse compensatoire qui vient sous la forme de signaux anti-inflammatoires médiés par IL-4, IL-10, MFG-E8 et les MDSC. Cet événement favorise un environnement immunosuppresseur qui réduit la capacité des APC à présenter les antigènes, désactive les LT et leur production de sCD40L. Ainsi, la différenciation des LB et les niveaux sériques d'Ig sont diminués. Cette immunodépression favorise les infections opportunistes qui mènent potentiellement au choc septique. Deux semaines post-brûlures, le système immunitaire commence à se rétablir et à développer une réponse activatrice compensatoire. Au 14^{ème} jour, des signaux activateurs comme l'IL-7 permettent le maintien des fonctions des LT et LB. Cette activation est accompagné d'un retour des niveaux d'Ig à la normale et à une restauration des défenses contre les pathogènes.

Le système immunitaire est altéré d'une façon où il fluctue entre un état pro- et anti-inflammatoire. Un environnement excessivement pro-inflammatoire induit des dommages graves aux organes qui mènent à une défaillance multiviscérale. Toutefois la tentative de compenser ces dommages tissulaires via des signaux anti-inflammatoires rend les patients susceptibles aux infections pouvant infliger des dommages encore plus sévères. Les modulations immunologiques chez les patients GB semblent très fortement impliquer les APC, dont les monocytes, macrophages et LB. Toutefois, les mécanismes exacts sont inconnus.

Nous émettons notre première hypothèse que les brûlures hyperactivent les cellules présentatrices d'antigènes, les APC, ce qui génère ultérieurement un milieu immunosuppresseur.

1.7 Le microbiome et son importance

1.7.1 Caractérisation du microbiome

Le microbiome constitue l'ensemble des microorganismes, leur génome et leurs interactions avec le microenvironnement qui les entoure. Le microbiome comprend divers types de microbes dont les bactéries, les archaebactéries, les virus et les levures. Toutefois dans ce projet, nous nous concentrons uniquement sur la population bactérienne. Le terme "microbiote" (à ne pas confondre avec "microbiome") fait allusion à la population microbienne dans un environnement définis sans tenir compte des conditions environnementales comme le pH et la salinité par exemple. Le compte, la diversité et le rôle du microbiote sont différents selon son habitat dans le corps humain, que ça soit au niveau de l'intestin, la peau, les poumons ou même la circulation sanguine. Le microbiome compte pour plus de 10^{14} de bactéries dans le corps humain, soit 10 fois le nombre de cellules humaines eucaryotes [236, 237]. Les fonctions essentielles et complexes du microbiome dans l'être humain continuent à être découvertes aujourd'hui. Les travaux collaboratifs du "human microbiome project" (HMP) ont permis d'accroître

1.7.2 Les techniques d'analyse du microbiome

A) Le gène codant l'ARNr 16S

Les cellules procaryotes incluant les bactéries, possèdent un bagage génétique distinct. L'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) est un composant de la petite sous-unité ARNr 30S. Cette petite sous-unité 30S en tandem avec la grosse sous-unité 50S forment le ribosome procaryote complet (70S). L'ARNr 16S est spécifique aux procaryotes alors que les cellules eucaryotes possèdent l'ARNr 18S. Ainsi, il serait possible de cibler le gène codant pour l'ARNr 16S (qu'on nomme l'ADN 16S) afin de discerner l'ADN bactérien dans un milieu abondant en matériel génétique humain. L'ADN 16S est une cible fréquemment utilisée pour évaluer le microbiome du corps humain. L'ADN 16S contient des régions conservées et partagées parmi beaucoup d'espèces bactériennes. Cependant,

l'ADN 16S présente aussi 9 régions hypervariables nommées V1 à V9. La séquence de ces régions varie entre les différents espèces et sous-espèces bactériennes [238].

B) La quantification des bactéries par qPCR

Le "*quantitative Polymerase Chain Reaction*" (qPCR) est une technique très employée dans l'étude de l'expression de gènes et consiste à amplifier une séquence spécifique d'ADN afin de la détecter et la quantifier.

La particularité du qPCR par rapport au PCR normale, est la possibilité d'estimer la quantité de la séquence d'ADN bactérien par exemple. L'utilisation d'une courbe de standards avec des quantités prédéterminées d'ADN bactérien, permet d'estimer le nombre de copies d'ADN et par extension le nombre de bactéries dans l'échantillon étudié. Le qPCR requiert entre autres le SYBR Green, un colorant qui permet de se baser sur l'intensité de la fluorescence émise par les séquences d'ADN afin de les quantifier. En revanche, il faut considérer que les bactéries peuvent avoir 1 à 15 copies de leur génome selon l'espèce bactérienne. Ainsi, la quantité approximative calculée par qPCR n'est pas complètement représentative de la quantité réelle de bactéries dans l'échantillon. Néanmoins, le qPCR demeure un des moyens de quantification bactérienne les plus pratiques et les plus souvent employés. Toutefois, le qPCR ne donne aucune idée sur l'identité des bactéries présentes dans l'échantillon. Pour identifier les bactéries, il faut utiliser la technique de séquençage de nouvelle génération pour évaluer la diversité bactérienne du microbiome [239].

1.8 Les interactions entre l'hôte et le microbiome

1.8.1 Le microbiome intestinal

A) Les relations entre le microbiome intestinal et l'hôte

L'intestin abrite le plus grand nombre de bactéries dans le corps humain, ainsi que la plus grande diversité avec plus de 1000 différentes espèces [240, 241]. D'où l'étude du microbiome à partir de matières fécales est la façon la plus courante. Les bactéries dans l'appareil digestif vivent en symbiose avec l'hôte. Les bactéries prolifèrent dans l'environnement intestinal, mais fournissent également des bénéfices à l'hôte, comme observé particulièrement avec les espèces *lactobacilles* [242]. Les bactéries résidant dans l'intestin influencent le métabolisme des nutriments. Un grand nombre de bactéries produisent des micronutriments comme les vitamines B9, B12, K et la biotine et facilitent l'absorption du calcium, magnésium et le fer [240, 243]. La quantité et la diversité bactérienne peut varier au sein d'un même individu selon différents facteurs tel que la diète, l'âge, la génétique de l'hôte, le système immunitaire, la localisation géographique, le contexte pathologique et l'utilisation d'antibiotiques [244-248].

L'intestin présente des mécanismes qui compartimentent ses composantes, prévenant une activation exagérée du système immunitaire face au grand nombre de microbes dans la lumière intestinale. Premièrement, ils existent des couches de mucus qui empêchent un contact direct entre les cellules épithéliales et les bactéries. Deuxièmement, l'hôte secrète des peptides antimicrobiens et IgA qui permettent de compartimentaliser les microorganismes et maintenir leur distance aux surfaces épithéliales. Troisièmement, les Tregs et les macrophages régulateurs participent à la tolérance et la suppression de la réponse immunitaire via des cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 [240, 241].

Toutefois, plusieurs études sur des souris sans germe ("germ free") démontrent que la flore intestinale influence le système immunitaire de l'hôte. Les bactéries intestinales sont impliquées dans le développement des LB en plasmocytes sécrétant IgA, la maturation des LT en Th, le recrutement des Tregs et la production de signaux pro- et anti-inflammatoires par les macrophages [240, 241, 249-251].

B) L'impact du microbiome intestinal chez les patients GB

Un grand nombre d'études montrent qu'un déséquilibre du microbiome intestinal est associé à divers pathologies inflammatoires, incluant les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, la maladie coéliqua, le diabète et le cancer [236, 251-256]. Un déséquilibre du microbiome est nommé la dysbiose et peut correspondre à des modifications quantitatives et/ou qualitatives.

Une dysbiose de la flore intestinale est aussi impliquée dans la modulation inflammatoire chez les patients atteints d'un choc comme les brûlures et le sepsis. Les patients souffrant d'un SIRS sévère présentent un compte inférieur de bactéries bénéfiques comme les espèces *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*; et une hausse des pathogènes opportunistes comme les espèces *Staphylococcus* et *Pseudomonas* au niveau de l'intestin [256, 257]. En effet, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont les pathogènes les plus courants chez les patients GB bactériémiques [26]. Les brûlures favorisent la croissance des espèces bactériennes aérobiques appartenant à la famille des Entérobactéries. Les Entérobactéries incluent les espèces *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, et *Citrobacter* qui sont potentiellement pathogéniques et responsables du sepsis [258]. En outre, les brûlures font augmenter la perméabilité intestinale conduisant à la translocation accrue des bactéries de l'intestin vers la circulation, les ganglions lymphatiques et les organes [258-262]. L'augmentation de la perméabilité intestinale survient précocement post-brûlures et est corrélée avec le %TBSA [263, 264]. Ainsi, la translocation des microbes intestinaux peut être un des mécanismes favorisant le développement du sepsis observé chez les patients GB [265, 266].

1.8.2 Le microbiome de la peau

A) Les relations entre le microbiome de la peau et l'hôte

La peau sert de barrière physique empêchant l'infiltration des microorganismes externes. Or, la peau est colonisée par un grand nombre de bactéries. Les microbiotes de la peau sont évidemment très dépendants du milieu écologique externe. La composition du microbiome de la peau varie aussi sur un même individu dépendamment du site

anatomique. Par exemple, les *Propionibacterium* spp. se trouvent surtout sur les surfaces sébacées, tandis que les *Corynebacterium* et *Staphylococcus* spp colonisent plutôt les sites humides [267].

Le microbiome de la peau et le système immunitaire forment une relation bidirectionnelle. Les kératinocytes peuvent détecter des pathogènes via les PAMPs pour réguler le système immunitaire inné et par extension l'immunité adaptative. Or, le système immunitaire est capable de reconnaître les bactéries inoffensives et bénéfiques sur la peau, d'où un mécanisme de tolérance médié par les Tregs est probablement impliqué [268, 269]. Mais, plusieurs désordres dermatologiques comme l'eczéma et le cancer de la peau sont associés à une dérégulation du système immunitaire [267, 270, 271]. Les patients immunodéprimés et vulnérables aux infections présentent une plus grande diversité du microbiote de la peau. La dysbiose chez ces patients corrèle avec la colonisation par des pathogènes bactériens comme *Staphylococcus Aureus* et des levures opportunistes du type *Candida* et *Aspergillus* [272].

B) L'impact du microbiome de la peau chez les GB

Les brûlures endommagent gravement l'intégrité de la peau et créent des portes d'entrées aux bactéries du milieu externe. Cette situation engendre des infections des plaies qui compliquent la cicatrisation et les greffes de peau. Le microbiome de la peau des patients GB est différent et plus varié que celui des sujets sains. Or, ce qui est intéressant est la similarité du microbiome des surfaces brûlées et des surfaces non-brûlées sur le même patient [273, 274]. L'altération du microbiome de la peau chez les patients GB varie selon le type d'infection. Les infections de la plaie sont positivement corrélées avec les espèces *Corynebacterium*; les pneumonies corrèlent positivement avec les espèces *Nesterenkonia* et *Halomona*; et le sepsis corrèle négativement avec les espèces *Corynebacterium* et *Enterococcus* [274]. Cette étude propose que l'identification des changements microbiens de la peau en corrélation avec les types d'infections permettra de prédire les chances de non prise des greffes. Elle suggère aussi l'application de probiotiques, composés de bactéries protectrices, afin de faciliter la prise de la greffe chez les patients GB.

L'implication du microbiome de la peau dans la modulation inflammatoire et l'immunosuppression chez les patients GB n'est pas encore bien élucidée.

1.8.3 Le microbiome du sang

La communauté scientifique a toujours perçu la circulation sanguine comme un milieu stérile dépourvu de présence microbienne. Cependant, des études récentes contestent cette notion en suggérant l'existence d'un microbiome périphérique, même chez les sujets sains [275]. Utilisant la méthode de qPCR et le gène de l'ARNr 16S comme cible, il est possible de détecter l'ADN bactérien extrait du sang total [276]. Plus précisément, si on sépare les fractions du sang, il paraît que la couche leuco-plaquettaire et la couche érythrocytaire contiennent le plus d'ADN bactérien, tandis que le plasma en contient le moins. Le microbiome sanguin est composé en majorité de protéobactéries et est différent du microbiome intestinal en termes de diversité bactérienne [276]. Par contre, ces différences remettent en question la notion que la majorité des bactéries en circulation proviennent d'une translocation d'origine intestinale. Néanmoins, la détection d'ADN bactérien dans le sang corrobore les autres études démontrant la présence de bactéries "dormantes" dans le sang et même à l'intérieur des globules rouges [277]. Une bonne proportion de ces bactéries dites dormantes sont vivantes, non-prolifératives et non-cultivables, d'où les difficultés de détection avec les méthodes conventionnelles comme les hémocultures [276]. De plus, ces cultures sont relativement lentes dans la détection des pathogènes. Des techniques plus adaptées comme le PCR, seraient plus rapides et sensibles pour la détection des bactériémies [278-280].

La translocation des bactéries pathogènes intestinales dans la circulation sanguine favorise les infections et le sepsis chez les patients GB. Ainsi, il serait intéressant d'explorer les altérations du microbiome sanguin en corrélation avec la modulation inflammatoire et la prévalence des infections nosocomiales. Il serait donc possible d'intégrer des analyses du microbiome du sang dans les unités des soins intensifs afin d'optimiser la thérapie antimicrobienne et gérer les infections post-brûlures.

1.8.4 Récapitulatif du microbiome chez les patients GB

Les patients GB connaissent des modifications importantes de leur microbiome intestinal et cutané, en tout au niveau de la diversité et de la quantité de bactéries. L'augmentation de la perméabilité intestinale couplée avec la rupture de l'intégrité cutanée conduit potentiellement à la translocation bactérienne dans la circulation. Nous suggérons que ce sont des sources bactériennes pouvant mener au sepsis et participer de façon significative aux modulations inflammatoires observées chez les patients GB.

Nous émettons donc l'hypothèse que le microbiome de la peau et du sang altère le système immunitaire en contribuant à l'immunodépression chez les patients GB.

Chapitre 2. Hypothèse et objectifs du projet

2.1 Hypothèses

Malgré les avancées dans le traitement des brûlures, la morbidité et la mortalité dues aux infections demeurent des défis majeurs. Les patients subissent des modifications intenses du système immunitaire qui mènent à l'immunosuppression et à la vulnérabilité face aux infections nosocomiales. Des modulations pro- et anti-inflammatoires systémiques semblent essentiellement impliquer les APC comme les monocytes, macrophages et les LB. Dans un premier temps, nous émettons l'hypothèse que les brûlures conduisent à l'hyperstimulation des APC, ce qui entraîne un milieu immunosuppresseur.

Nous nous intéressons également à l'impact du microbiome sur l'immuno-modulation chez les GB. La rupture de la peau, les infections nosocomiales et les divers traitements modifient fortement la composition du microbiome des patients. Donc dans un deuxième temps, nous suggérons que les microbiomes de la peau et du sang des patients soient impliqués dans la modulation inflammatoire et l'immunosuppression chez les GB.

2.2 Objectifs

Le premier objectif est de déterminer l'effet de la composition du sérum des patients GB sur les cellules immunitaires, avec une emphase sur les APC. Pour ce faire, les leucocytes de donneurs sains, dont les monocytes, macrophages, LT et LB seront incubés *in vitro* en présence de sérum de patients GB. Le deuxième objectif est d'explorer les interactions entre les APC, notamment les monocytes et les LB, afin de mieux comprendre la séquence d'activation des leucocytes dans le contexte des patients GB.

Le troisième objectif est d'optimiser les techniques d'extraction, de détection et de quantification de l'ADN 16S bactérien à partir du sang et de la peau. Enfin, le quatrième objectif est d'évaluer les quantités de bactéries en circulation chez les patients GB.

Chapitre 3. Matériel et méthodes

3.1 Recrutement des patients et obtention des échantillons biologiques

Les patients GB ont été recrutés à l'unité des grands brûlés au CHUM (hôpital Hôtel-Dieu de Montréal). Les patients ont consenti à l'étude approuvée par le comité d'éthique de la recherche du CHUM. Des prises de sang d'un volume de 50 mL sont prises à 4 différents temps post-brûlures, soit aux jours 0, 2, 5 et 14 (d0, d2, d5 et d14). Malgré que les échantillons prélevés dans la deuxième semaine varient entre les jours 12 et 16, seulement le jour 14 (d14) est représenté dans le but de simplifier la compréhension des figures. Les échantillons de sang sont transportés au centre de recherche du CHUM (CRCHUM). Les tubes de sang sont centrifugés à 1800 g pendant 15 minutes pour séparer les fractions et obtenir le plasma. Ensuite l'utilisation du gradient Ficoll (WISSENT inc.) permet l'isolement des PBMC. Les PBMC ont été lavés avec du PBS trois fois et resuspendus dans un milieu de congélation contenant du FBS et 10% de DMSO. Le plasma et les PBMC des patients GB sont enfin conservés respectivement à -80°C et dans l'azote liquide jusqu'à leur utilisation.

Pour les 4 patients GB recrutés en 2017, la récolte des échantillons sont fait à différents points de temps, soit aux jours 0, 3, 6 et 12 (d0, d3, d6, d12). Ces différents temps reflètent les changements de pansements. Comme les autres patients, 50 mL de sang sont prit à chaque point de temps; et le plasma et les PBMC sont isolés et congelés. Une partie du sang récolté est dédiée à l'étude du microbiome du sang (voir ci-dessous).

3.2 Manipulation *in vitro* des cellules immunitaires de donneurs sains en présence de sérum de patients GB

La première étape est la prise de sang de donneurs sains remplissant 5 à 15 tubes de 10 mL selon le nombre de cellules requit à chaque expérience. Encore une fois, les PBMC sont isolés par ficoll et lavés trois fois avec du PBS. L'utilisation des trousse EasySep (StemCell Technologies) a permis de purifier spécifiquement les monocytes, LT ou LB

en les sélectionnant avec des anticorps et des billes magnétiques. L'emploi d'un aimant (StemCell Technologies) permet de séparer les cellules liées aux billes du restant des leucocytes. La purification des monocytes et des LT est fait par sélection positive, tandis que les LB sont obtenus par sélection négative ou par enrichissement. Le sérum de patients GB est obtenu suite au traitement du plasma avec 22 mM de calcium (CaCl_2) pendant 1 heure à 37°C. Ensuite les cellules immunitaires des donneurs sains sont suspendues dans un milieu Iscove (WISSENT inc.) contenant 1% de Penicillin-Streptomycin (WISSENT inc.), 1% de Glutamax (GIBCO) et 0,02% de gentamycine (WISSENT Bio Products). La concentration de sérum de patients GB (sérum GB) ou de donneurs normaux (sérum ND) est 7.5% du volume. Dans le cas échéant, un ajout de milieu Iscove avec les mêmes concentrations finales des substances est effectué à chaque 3 jours de culture.

Les monocytes d'un donneur sain sont incubés dans une plaque de 48 puits (3×10^5 cellules/puits) en présence de sérum GB ou sérum ND pendant 24h et 48h à 37°C. Pour l'expérience des macrophages, les monocytes d'un donneur sain sont cultivés pendant 5 jours avec du sérum autologue afin de les différencier en macrophages. Au 5^{ème} jour les macrophages sont lavés et cultivés en présence de sérum GB et sérum ND pendant 24h. Au 6^{ème} jour, les macrophages sont analysés par cytométrie en flux.

Les LT de 2 donneurs sains sont incubés dans une plaque de 96 puits (10^5 cellules/puits) avec le sérum GB ou sérum ND servant de contrôle. En outre, les LT sont non-stimulés ou stimulés avec 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'OKT3 (eBioscience) fixé sur la surface des puits et 300 IU/ μL d'IL-2 (Novartis) pendant 24 et 48 heures à 37°C. Chaque condition est faite en duplicata. Les valeurs des LT non-stimulés sont soustraites des valeurs des LT stimulés pour chaque condition afin d'éliminer le bruit de fond. Finalement, la moyenne des données des deux donneurs sains est présentée.

Les LB d'un donneur sain sont marqués avec 1 μM de Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Invitrogen) et sont mis en culture dans une plaque de 48 puits (3×10^5 cellules/puits) pendant 6 jours à 37°C. Les LB sont stimulés avec 40ng/mL d'IL-4 (PreproTech), et en présence ou absence de 10% de sCD40L (Multimerics Biotherapeutics Inc.). Le produit du sCD40L utilisé provient d'un surnageant avec une

concentration inconnue. Étant donné que la concentration de sCD40L n'a pas été quantifiée, le sCD40L ajouté aux milieux de culture correspond à 10% du volume total. Les LB sont aussi incubés en présence de sérum GB ou sérum ND, et cultivés seuls ou co-cultivés avec les monocytes du même donneur sain avec un ratio 1:1. Dans le cas des expériences de transmigration, les LB sont séparés des monocytes par une membrane en polycarbonate de 0.4µm (COSTAR). Au 6ième jour, les LB sont analysés par cytométrie en flux.

3.3 Analyse du phénotype des cellules immunitaires par cytométrie en flux.

Suite à la culture dans une plaque à 37°C, les cellules immunitaires sont décollées et lavées avec du PBS. L'utilisation de 1mM d'anticorps IgG humaines non-fluorescents pendant 10 min permet de bloquer les récepteurs Fc de surface et éviter les marquages non-spécifiques. Les étapes qui suivent emploient une solution de PBS contenant 2.5% d'albumine de sérum bovin (BSA) et 0.5% d'azoture de sodium afin de maintenir la viabilité et l'intégrité cellulaire. Les molécules de surface d'intérêt sont ensuite liées par des anticorps spécifiques couplés à des fluorochromes pendant 20 min à 4°C et dans le noir. Tous les anticorps utilisés proviennent de BD Bioscience. Par la suite, une dernière série de lavages est effectuée. En parallèle, plusieurs contrôles contenant des billes liant chacun des fluorochromes sont préparés. Ces contrôles de compensation servent à corriger le chevauchement des spectres d'émission des fluorochromes. Suite au processus de marquage, les échantillons passent au cytomètre en flux Fortesa (BD LSRFortessa™). L'acquisition des données est réalisée tout d'abord avec le programme BD Diva, alors que l'analyse détaillée des données est faite par la suite avec le programme FlowJo V10.

Les LT sont sélectionnés avec le marqueur CD4 et le pourcentage de cellules exprimant CD40L de surface est déterminé. Les monocytes et les macrophages sont sélectionnés avec les marqueurs de surface CD11c et CD14. L'évaluation du phénotype des monocytes est effectuée en mesurant la co-expression de CD14 et CD16. L'étude de la polarisation et de l'activation des macrophages est faite en quantifiant l'expression de

CD206, CD23 et CD80. Les LB sont sélectionnés avec le marqueur CD19 et leur prolifération est évalué avec l'expression de la couleur FITC émit par le CFSE intracellulaire.

3.4 Analyse des facteurs solubles dans le plasma et les surnageants par ELISA

Toutes les expériences ELISA suivent généralement le même concept. Les puits de la plaque sont tout d'abord recouverts avec un anticorps primaire de capture spécifique à la molécule d'intérêt. Les puits sont ensuite lavés plusieurs fois avec une solution contenant du PBS 1X et différents concentrations de Tween 20 dépendamment des protocoles des compagnies. Une solution de blocage est ensuite rajoutée pendant 2 heures afin d'éviter les liaisons non-spécifiques. Après une autre série de lavages, les échantillons et les contrôles sont appliqués à la plaque en duplicata pendant 2 heures. Suite à une autre étape de lavages, l'anticorps secondaire de détection couplé à l'enzyme peroxydase de raifort (HRP) est rajouté à la plaque. Un dernier lavage élimine les anticorps de détection non-liés aux molécules d'intérêt. Par la suite, 100 µL de substrat TMB (NEOGEN corporation) rajoutés aux puits déclenchent une réaction catalysée par l'enzyme HRP. Cette réaction mène à un produit coloré en bleu dont l'intensité est proportionnelle à la concentration dans chaque puits. Après environ 20 minutes, la réaction est arrêtée avec 50µL d'acide sulfurique 1M et la coloration est convertie du bleu au jaune. Les plaques sont immédiatement insérées dans un lecteur de plaque (VersaMax™). Les densités optiques sont lues à 450 nm et 540 nm, et les données sont enregistrées avec le programme Softmax Pro 4.7. Les valeurs lues à 540nm sont soustraites de celles lues à 450nm afin de corriger les imperfections optiques. La concentration des échantillons est calculée avec l'équation linéaire établit avec la courbe standard.

Certains protocoles suggèrent une pré-dilution des échantillons et une agitation de la plaque durant les temps d'incubation. Les lavages et l'aspiration des plaques sont effectués avec une laveuse de plaque de type 405 TS™ (Biotek® instruments).

L'étude de la concentration de BAFF en circulation est faite à partir d'échantillons de plasma de patients GB pré-congelés à -20°C. La mesure des niveaux de BAFF soluble est réalisée avec la trousse Human BAFF/BLyS/TNFSF13B Quantikine ELISA Kit (R&D Systems). Pour les expériences *in vitro*, les surnageants des cellules immunitaires sont récupérés et congelés à -20°C. Avec les surnageant des LT incubés avec différents séra, le sCD40L est mesuré avec la trousse Human CD40 Ligand/TNFSF5 DuoSet ELISA (R&D Systems). Pour les expériences des LB soumis aux conditions mentionnées ci-dessus, la concentration des immunoglobulines IgA, IgG et IgM sont mesurées avec 3 trousse ELISA de la même compagnie (ThermoFisher). Après 6 jours de culture des LB, les cellules sont lavés et resuspendues pendant 24h dans un milieu contenant l'insuline-transferrine-sélénium (ITS) qui substitut le sérum. Il s'agit d'une procédure permettant d'éliminer les traces d'Ig d'origine sérique et d'éviter les faux positifs en ELISA.

3.5 Extraction de l'ADN à partir d'échantillons de sang et de la peau

L'extraction de l'ADN d'échantillons de sang de donneurs sains et de patients GB est faite à partir de 200 µL de sang dans un tube eppendorf 1.5 mL. Les outils et solutions utilisés pour extraire l'ADN proviennent de la trousse QIAamp[®] DNA Mini Kit (QIAGEN). L'ajout de 20 µL de protéinase kinase et 200 µL d'une solution de lyse AL permet de détruire les parois des cellules afin de libérer l'ADN. Dans certaines expériences d'optimisation de la technique, des étapes de lyse mécanique dans des tubes de billes en verre (NucleoSpin[®]) et des agitations à haute vitesse, sont rajoutées dans le but de maximiser la destruction des membranes cellulaires. L'échantillon est incubé à 56°C pendant 30 min et puis 200 µL d'éthanol sont rajoutés. Le total du volume est ensuite transféré dans un tube contenant une colonne d'extraction qui fixe l'ADN et filtre le liquide de suspension. Des étapes de lavages suivent avec 500 µL de deux solutions de lavages AW1 et AW2. Des centrifugations de 3 min entre chaque étape de lavage permettent d'éliminer les solutions AW1 et AW2. L'élution de l'ADN retenu dans la colonne est effectuée avec 50 µL d'eau de grade moléculaire. L'ADN élué est récupéré dans des tubes de 1,5 ml de type BIOPUR (Eppendorf AG.) et congelé à -20°C. Toute la

méthode d'extraction de l'ADN du sang est effectuée sous une hotte stérile et avec l'utilisation d'embouts de pipette filtrés. Cependant, lorsque le test d'optimisation de la technique implique l'ajout de bactéries cultivées, les manipulations sont faites dans un milieu non-stérile afin de ne pas contaminer les hottes stériles. La concentration d'ADN total extrait (en ng/mL) et la pureté est mesurée avec l'appareil NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.)

L'extraction de l'ADN de la peau de donneurs sains est réalisée d'une différente façon que celui du sang. Premièrement, des frottis de la peau sont faits avec des dispositifs de prélèvement (Puritan Diagnostics LLC) préalablement humidifiés dans une solution SCF-1 (50 mM Tris, 1mM EDTA, 0,5% Tween 20 et pH=8,0). Suite aux frottis d'environ 50 ou 100 allés-retours sur la peau, les écouvillons sont trempés dans une solution de stabilisation du microbiome de type P-117 (DNA Genotek Inc.). Les bactéries et leur ADN reste stable dans cette solution jusqu'à 4 semaines. L'extraction de l'ADN des bactéries de la peau est faite à Génome Québec et la trousse employée est le QIAamp PowerFecal DNA Kit (QIAGEN).

3.6 Détection et quantification de l'ADN bactérien par qPCR

L'ADN bactérien extrait est dilué dans l'eau de grade moléculaire pour obtenir 150ng d'ADN total dans chaque puits. En parallèle, chaque puits de la courbe standard du qPCR contient à la fois une quantité connue d'ADN bactérien et 150ng d'ADN humain mâle (Promega Corporation). Les puits de contrôles négatifs contiennent 150ng d'ADN humain seule ou de l'eau de grade moléculaire. Les puits d'échantillons et de la courbe standard sont donc normalisés à 150ng d'ADN humain. Les échantillons et les standards sont faits en triplicata. Le mélange utilisé pour le qPCR contient l'agent fluorescent KAPA SYBR Fast qPCR Master Mix 2X (KAPA Biosystems), ainsi que 5 amorces qui sont spécifiques à la région V6 de l'ADN 16S et sont pré-dilué à 10 μ M. Ce mélange est préparé dans une enceinte Clone Zone[®] pré-stérilisée aux UV. Chaque puits contient un volume 20 μ L, dont 10 μ L de KAPA SYBR, 0.2 μ L de chacun des 5 amorces et enfin 9 μ L de l'échantillon d'ADN d'intérêt. La plaque est scellée avec un film adhésif et

introduit dans un thermocycleur de type Step One Plus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems). Le qPCR débute avec 3 minutes de dénaturation de l'ADN à 95°C suivi de 40 cycles de 3 secondes à 95°C et 20 secondes à 60°C. L'acquisition de la fluorescence à chaque cycle est effectuée durant les 20 secondes à 60°C. À partir des Ct mesurés et de l'équation logarithmique de la courbe standard, la quantité d'ADN bactérien est calculée pour chaque échantillon. Un membre de notre laboratoire a déterminé l'équivalence bactérienne basée sur *E.coli*. À partir de la quantité d'ADN établit avec la courbe standard, le nombre d'équivalents bactériens par 150 ng dans les échantillons d'ADN est déterminé. Dans le cas des échantillons de sang, le nombre d'équivalents bactériens est calculé par rapport au volume de sang (par 200µL ou par mL).

3.7 Statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées avec les programmes Graphpad Prism 6® (GraphPad Software, Inc.) et IBM SPSS Statistics 24. Le test ANOVA non-paramétrique de Friedman est utilisé pour l'analyse des mesures répétées dans les expériences *in vitro* et la mesure de facteur soluble *in vivo* et de la quantité d'ADN 16S. La comparaison de 2 mesures répétées est faite avec le test Wilcoxon. Le test T apparié est utilisé pour comparer deux groupes dans les expériences *in vitro* et d'extraction de l'ADN du sang. Le test de Wilcoxon-Mann-Whitney est utilisé dans l'analyse de facteurs solubles *in vivo* pour les comparaisons entre les contrôles ND et les échantillons de patients GB. Les valeurs p inférieures à 0,05 indiquent des différences significatives. Dans les figures, un $p < 0.05$, $p < 0.01$ et $p < 0.001$ sont représentés avec les symboles *, ** et *** respectivement.

Chapitre 4. Résultats

4.1 Le sérum de patients GB altère le phénotype des monocytes *in vitro*, mais n'affecte pas le phénotype des macrophages.

Les APC, en plus d'être des régulateurs importants de l'inflammation, constituent un lien crucial entre la réponse innée et la réponse adaptative. Selon nos résultats préliminaires couplés avec la littérature existante, la dérégulation des APC est un facteur central dans l'immunosuppression chez les patients GB. Afin d'étudier l'altération des APC dans le milieu inflammatoire des patients GB, les cellules immunitaires d'un donneur sain sont cultivées en présence de sérum GB pendant 24h et 48h. La première APC du système immunitaire inné évaluée est le monocyte. La figure 6 présente tout d'abord un dotplot représentatif qui permet de visualiser l'altération des sous-types monocytaires dans une seule expérience après seulement 24h. Les deux graphiques qui suivent représentent la compilation des quatre expériences après 24h et 48h d'incubation. La figure 6 montre premièrement que les monocytes adoptent majoritairement la forme classique $CD14^+CD16^-$ dans un milieu sain (sérum ND). Cependant, en présence de sérum de patients GB du jour 2 (d2), nous observons un virage significatif vers un profil intermédiaire $CD14^+ CD16^+$ après 24h et 48h de culture. Il n'y a pas de modifications significatives pour le pourcentage de monocytes non-classiques. L'expérience est répétée plusieurs fois (n=4) avec le sérum de 4 patients GB.

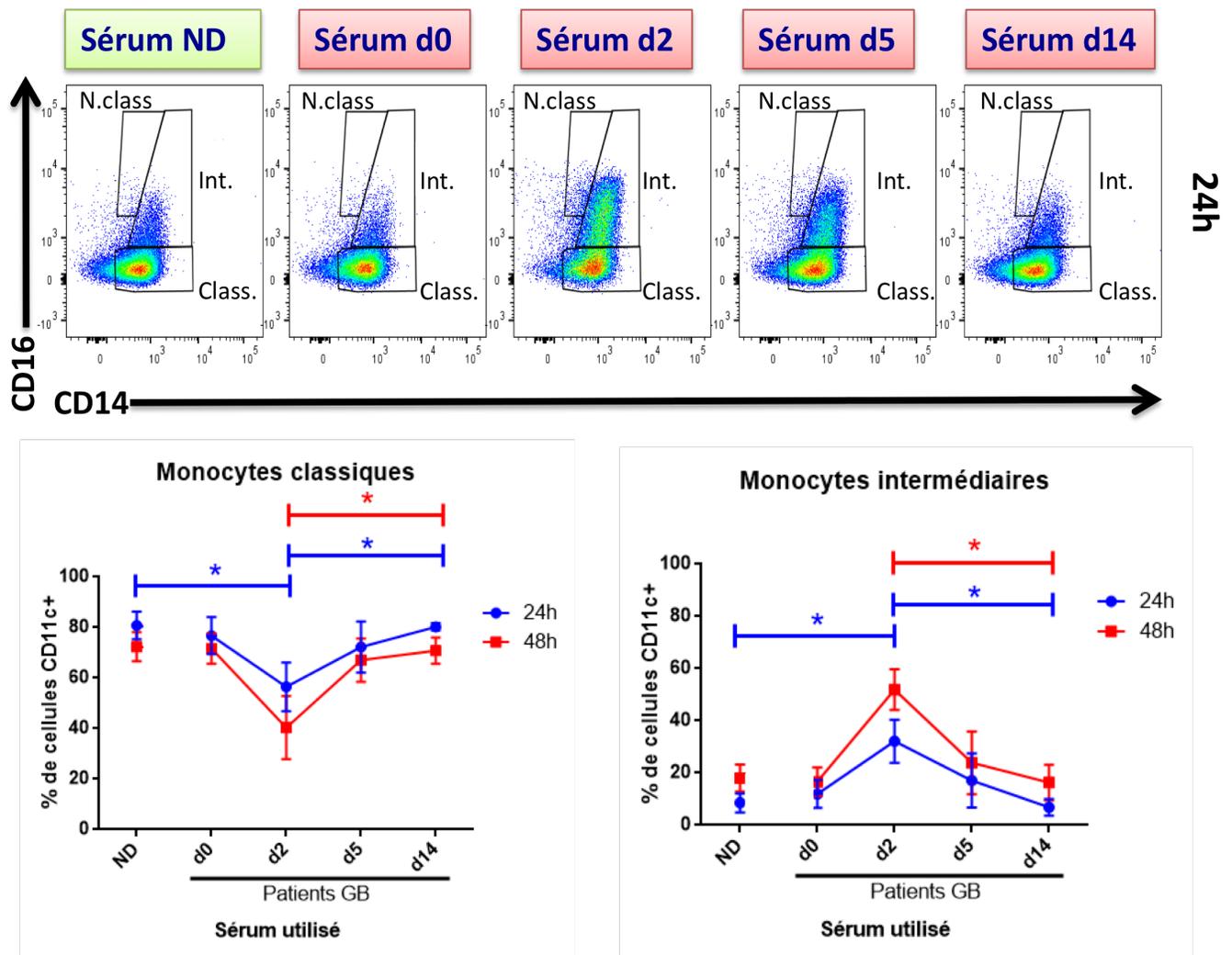


Figure 6. Les monocytes classiques d'un donneur sain se différencient au sous-type intermédiaire en présence du sérum GB. Les monocytes d'un donneur sain sont purifiés à partir des PBMC et sont incubés avec 7.5% de sérum ND ou de sérum GB pendant 24h et 48h. Les monocytes sont sélectionnés par cytométrie en flux avec le marqueur CD11c. Les pourcentages des trois sous-types sont déterminés en se basant sur l'expression de CD14 et CD16. L'expérience est répétée 4 fois (n=4) avec le sérum de différents patients GB et la moyenne et l'écart-type sont représentés. Le test statistique ANOVA de Friedman est utilisé. Le symbole * représente un $p < 0.05$.

Après avoir démontré l'effet modulateur du sérum GB sur les monocytes, il est important de tester son effet sur le phénotype des macrophages qui influencent également le statut inflammatoire des patients. Les macrophages dérivés de monocytes d'un donneur sain sont cultivés avec du sérum GB pendant 24h. La polarisation en macrophages M2 est testée avec l'expression de CD206 et CD23, et l'activation et la différenciation en M1 est testée avec l'expression de CD80. Aucune différence significative n'est observée en présence de sérum GB par rapport au contrôle sérum ND. L'expérience est répétée avec le sérum de 4 différents patients GB et est représentée dans la figure 7.

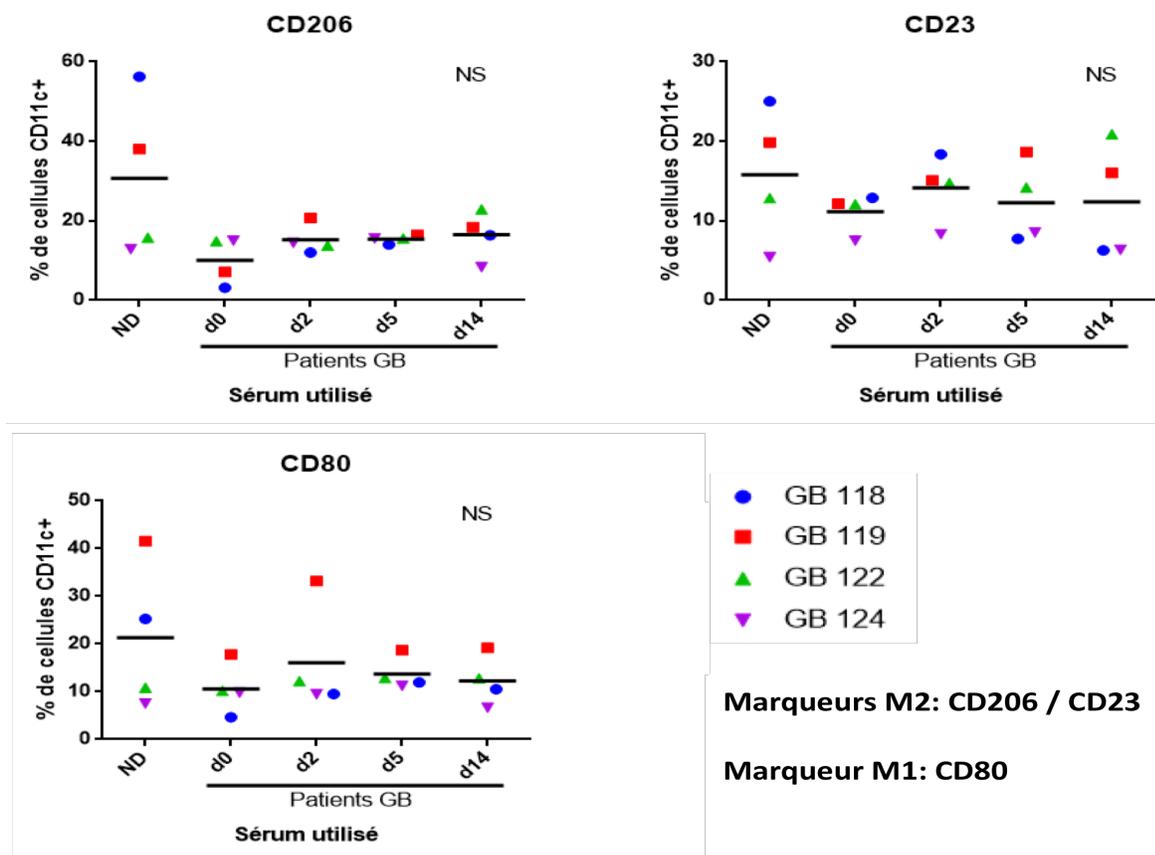


Figure 7. Le phénotype et la polarisation des macrophages d'un donneur sain ne sont pas altérés en présence de sérum GB. Les monocytes sont purifiés à partir des PBMC d'un donneur sain et sont incubés avec du sérum autologue pendant 5 jours pour les différencier en macrophages. Au 5^{ème} jour, les macrophages sont lavés et cultivés en présence de sérum ND ou de sérum GB. Les macrophages sont sélectionnés au FACS avec les marqueurs CD11c et CD14. La polarisation des macrophages en M2 est évaluée avec l'expression des récepteurs CD206 et CD23 et la polarisation en M1 avec l'expression de CD80. L'expérience est répétée 4 fois (n=4) avec le sérum de différents patients GB. Le test statistique ANOVA de Friedman est utilisé. NS: non significatif.

4.2 Le sérum de patients GB n'altère pas l'expression de CD40L par les LT *in vitro*.

Le modèle *in vitro* ayant été testé sur les cellules du système immunitaire inné, la prochaine étape est de l'appliquer aux acteurs de l'immunité acquise. Étant donné que le sCD40L diminue drastiquement *in vivo* selon nos études préliminaires, il est primordial de modéliser ces observations sur les LT *in vitro*. Pour ce faire, les LT de 2 donneurs sains sont cultivés en présence de sérum GB pendant 24h et 48h. Les résultats montrent que l'expression de CD40L de surface (Figure 8A) et la production de sCD40L (Figure 8B) ne sont pas affectées significativement en présence de sérum GB par rapport au sérum ND. L'expérience est effectuée avec le sérum de 3 patients GB et le sérum contrôle de 3 donneurs normaux.

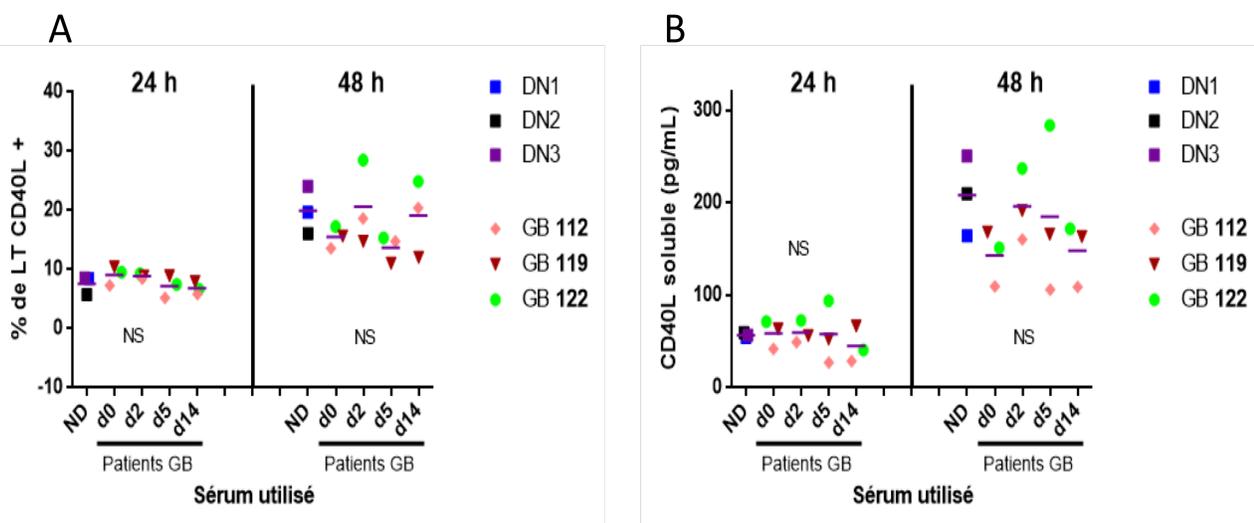


Figure 8. L'expression de CD40L soluble et de surface par les LT de donneurs sains n'est pas modifiée en présence de sérum de patients GB. Les LT sont purifiés à partir des PBMC de deux donneurs sains et sont incubés avec 7.5% de sérum ND ou de patients GB pendant 24h et 48h. Les LT ont été stimulés avec IL-2 et OKT3 ou bien ont été cultivés sans stimulation. Les valeurs des LT non stimulés sont soustraites des valeurs des LT stimulés afin de supprimer le bruit de fond. La moyenne des deux donneurs sains est représentée dans les deux graphiques. Les séras de 3 donneurs sains et 3 patients GB sont utilisés (n=3). Le test statistique ANOVA de Friedman est utilisé. A. Représentation du pourcentage des LT exprimant CD40L de surface évalué par FACS. B. Représentation de la concentration de CD40L soluble en surnageant produits par les LT. NS: non significatif.

4.3 Le sérum de patients GB et les monocytes/macrophages altèrent les fonctions des LB.

Ensuite, l'effet de l'environnement inflammatoire des patients GB est testé sur la prolifération du LB, une APC de l'immunité adaptative. Les LB d'un donneur sain ont été pré-marqués avec le CFSE avant d'être cultivés en présence de sérum GB ou sérum ND pendant 6 jours. Chaque condition est soumise à différents stimuli. Le premier stimulus de l'IL-4 seul sert de contrôle négatif de la prolifération. Le deuxième stimulus voit le rajout de sCD40L pour induire la prolifération des LB. Le troisième stimulus inclut la présence de monocytes autologues en co-culture avec les LB avec un ratio 1:1. La figure en annexe (figure S1) présente la courbe dose-réponse du sCD40L qui montre une prolifération maximale des LB avec seulement 2% de sCD40L. Ainsi, la concentration de sCD40L rajoutée dans nos expériences (10% du volume) sature la prolifération des LB. La figure 9A révèle un exemple représentatif de l'expérience globale. En regardant les échantillons contrôles avec le sérum ND, les LB ne prolifèrent pas en présence d'IL-4 seule et ceci est traduit par un indice de division (DI) de 0. Les LB prolifèrent avec l'ajout de sCD40L, représenté par un DI de 0,914 avec le sérum ND. La présence de monocytes en plus du sCD40L favorise davantage la prolifération des LB, avec un DI de 2,274. Par contre, les LB stimulés par sCD40L et en présence de sérum GB prolifèrent moins que le contrôle ND associé et ceci est représenté par un DI de 0,386 par rapport à 0,914. Or, la co-culture des LB avec des monocytes corrigent partiellement la prolifération inhibée par le sérum GB et fait augmenter le DI à 1,356. La figure 9B montre les résultats de 4 expériences répétées avec les séra des patients 18, 19, 22 et 24, ainsi que la compilation des 4 expériences. Les valeurs de DI ont été normalisées par rapport à la condition IL-4 + CD40L du contrôle ND qui est placée à un DI de 100. Dans chaque expérience, les LB ont une tendance à proliférer moins en présence de sérum GB et la présence de monocytes a tendance à corriger la division des LB. La compilation des 4 expériences est effectuée en faisant la moyenne de chaque sous-groupe. Premièrement, en présence de CD40L et +/- monocytes, il existe une différence significative globale du DI entre le contrôle sérum ND et le sérum GB (sans monocyte: $p=0,0217$; avec monocytes: $p=0,0109$). Deuxièmement, la présence des monocytes stimule significativement la prolifération des LB ($p=0,002$).

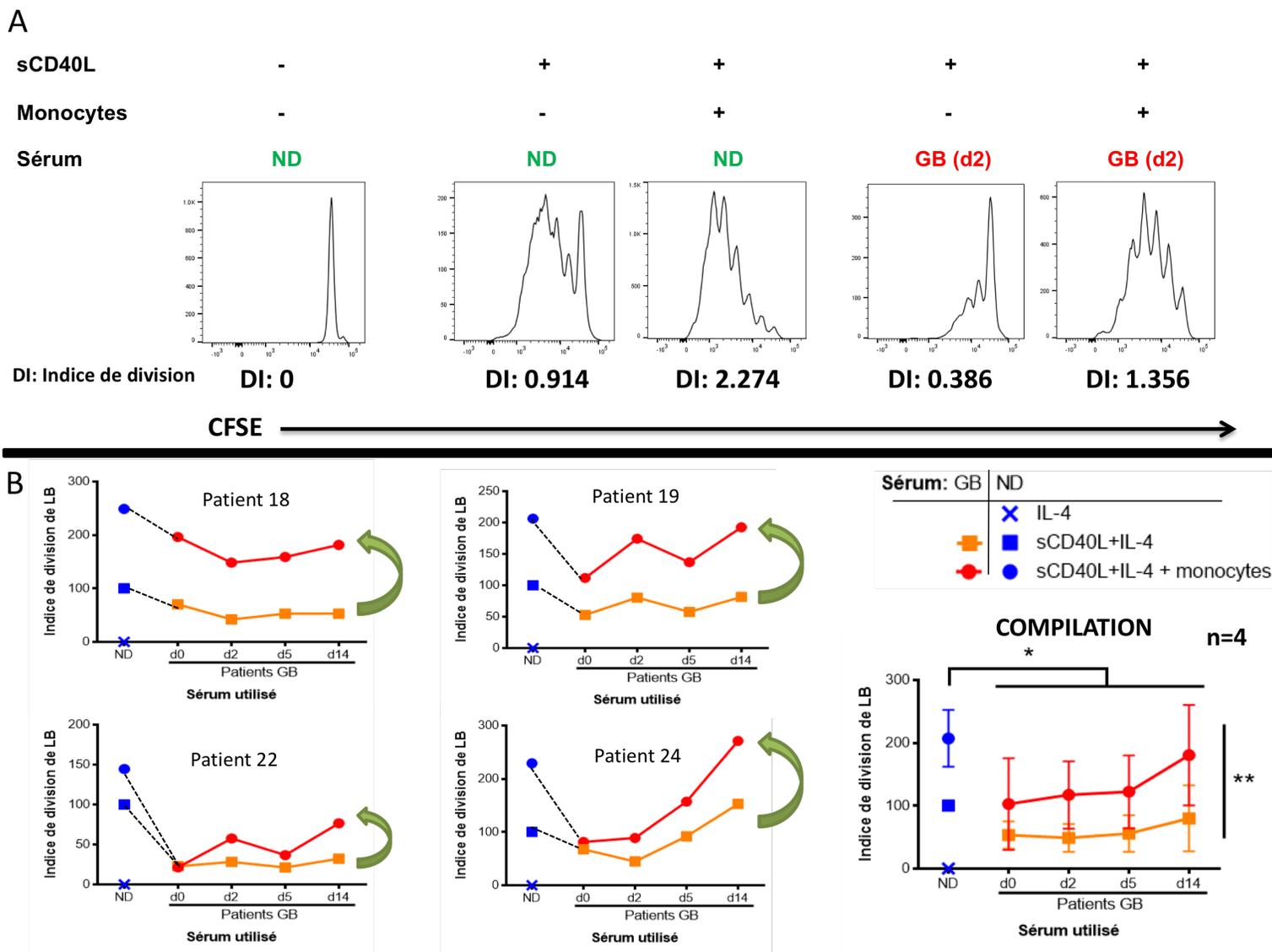


Figure 9. La prolifération des LB d'un donneur sain est diminuée en présence de sérum GB et ceci est partiellement corrigé en présence de monocytes/macrophages. Les LB sont purifiés à partir des PBMC d'un donneur sain, marqués avec le CFSE et incubés avec 7.5% de sérum ND ou de sérum GB pendant 6 jours. Toutes les conditions incluent l'ajout d'IL-4. De plus, les LB sont cultivés en présence ou en absence de sCD40L. En outre, les LB sont mis en culture avec ou sans la présence de monocytes autologues purifiés. Les LB sont sélectionnés au FACS avec le marqueur CD19. L'étude de leur prolifération est basée sur la perte du signal CFSE et représentée avec l'indice de division (DI) calculé. L'expérience est répétée 4 fois (n=4) avec les sera de 4 différents patients GB. Le test statistique ANOVA de Friedman est utilisé pour comparer l'ensemble des conditions dans un groupe et le test t apparié pour comparer les deux groupes +/- monocytes. **A.** Résultats bruts représentatifs de la prolifération des LB modulée par la présence de CD40L, de monocytes et de sérum GB. **B.** Compilation des 4 expériences présentant la modulation de la prolifération des LB sous l'effet du sérum GB et des monocytes.

Puisque l'environnement inflammatoire des patients GB altère la prolifération des LB, il est nécessaire de voir si le sérum GB influence également la production d'anticorps par les LB. Ainsi, le surnageant des LB soumis aux mêmes conditions que ci-dessus, est récolté. Les LB sont cultivés avec le sérum de 5 patients GB en parallèle à ceux cultivés avec le sérum ND contrôle. La concentration, traduite en quantité (en ng) d'IgA, IgG et IgM produits en 24h par les LB, est mesurée par ELISA.

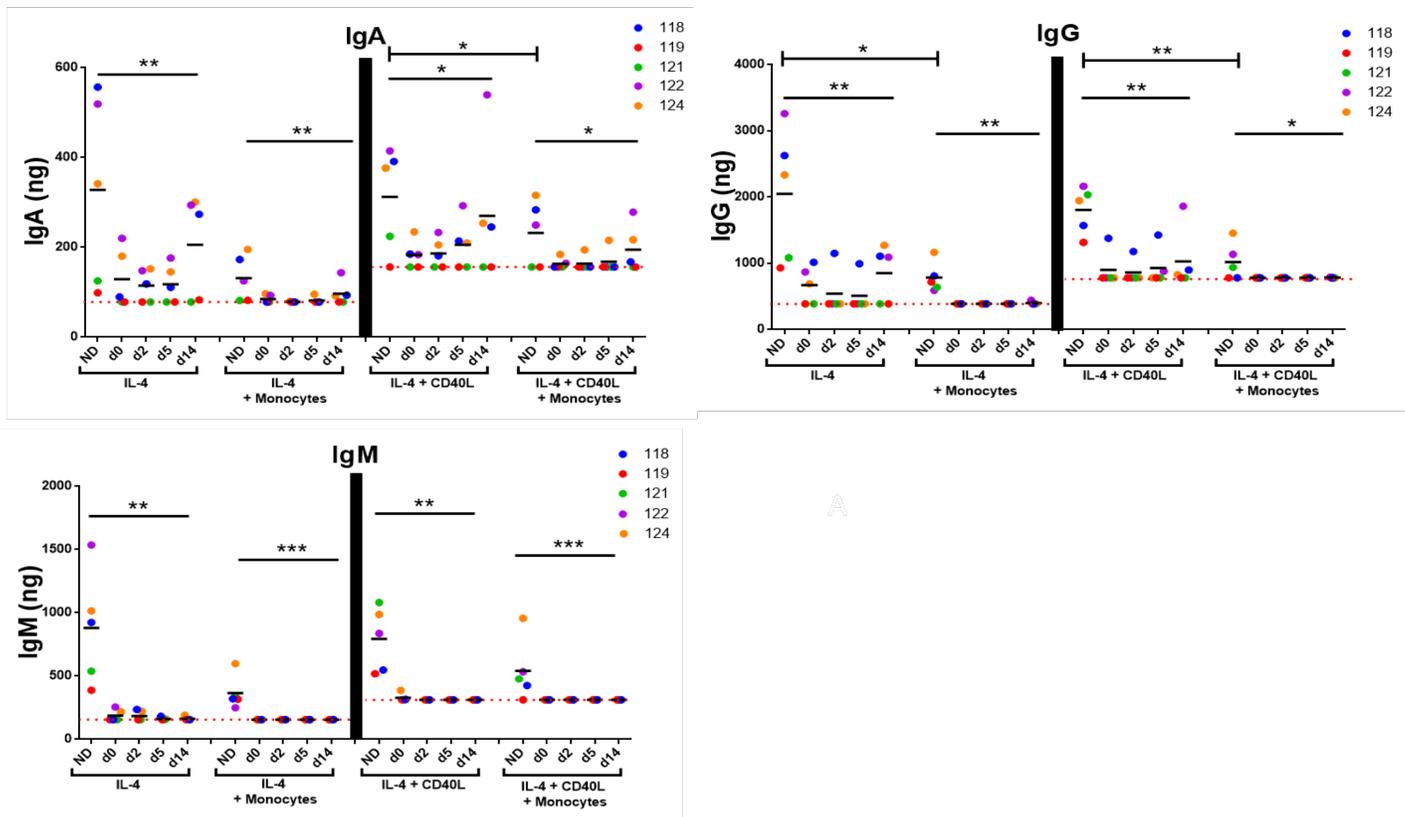


Figure 10. La production d'IgA, IgG et IgM par les LB d'un donneur sain est diminuée en présence de sérum GB et diminue davantage en présence de monocytes/macrophages. Les LB d'un donneur sain sont cultivés avec 7.5% de sérum ND ou sérum GB; et en présence ou absence de sCD40L et de monocytes autologues pendant 6 jours. Au 6^{ème} jour, les LB sont lavés et resuspendus dans un milieu sans sérum pendant 24h. Les surnageants sont récupérés et les concentrations d'IgA, IgG et IgM sont mesurées par ELISA et ensuite transformées en quantité (en ng) en fonction du volume des surnageants. Les conditions sans sCD40L avaient un volume de 50 μ L alors que celles avec sCD40L avaient un volume de 100 μ L. La colonne noire sépare les deux groupes +/- sCD40L. Les pointillés oranges représentent la limite de détection et varient entre les groupes +/- sCD40L à cause des volumes différents. L'expérience est répétée avec le sérum de 5 patients GB (n=5). Le test statistique de Friedman est utilisé pour comparer les conditions au sein d'un même groupe et le test t apparié pour comparer les groupes +/- monocytes. Les symboles *, ** et*** représentent respectivement un $p < 0.05$, $p < 0.01$ et $p < 0.001$.

La figure 10 démontre que le sérum GB réduit significativement la production d'IgA, IgG et IgM par les LB comparativement au sérum ND. Cet effet inhibiteur du sérum GB a lieu en présence et en absence de sCD40L et de monocytes. En plus, la présence de monocytes inhibe significativement la sécrétion d'IgG et IgA par les LB. Ainsi, les monocytes limitent la différenciation des LB, malgré leur effet stimulateur sur la prolifération des LB.

Après avoir démontré une capacité des monocytes/macrophages à réguler la prolifération et la production d'anticorps, il est important de déterminer par quel moyen cet effet est possible. Dans un premier temps, il est intéressant de mesurer les niveaux de BAFF en circulation chez les patients GB afin de lier les monocytes/macrophages à la dérégulation des LB observée *in vivo*. Ainsi, la concentration de BAFF (en pg/mL) dans le plasma de 21 patients GB est mesurée par ELISA. La figure 11A montre une augmentation significative de BAFF aux jours 5 et 14 chez les patients.

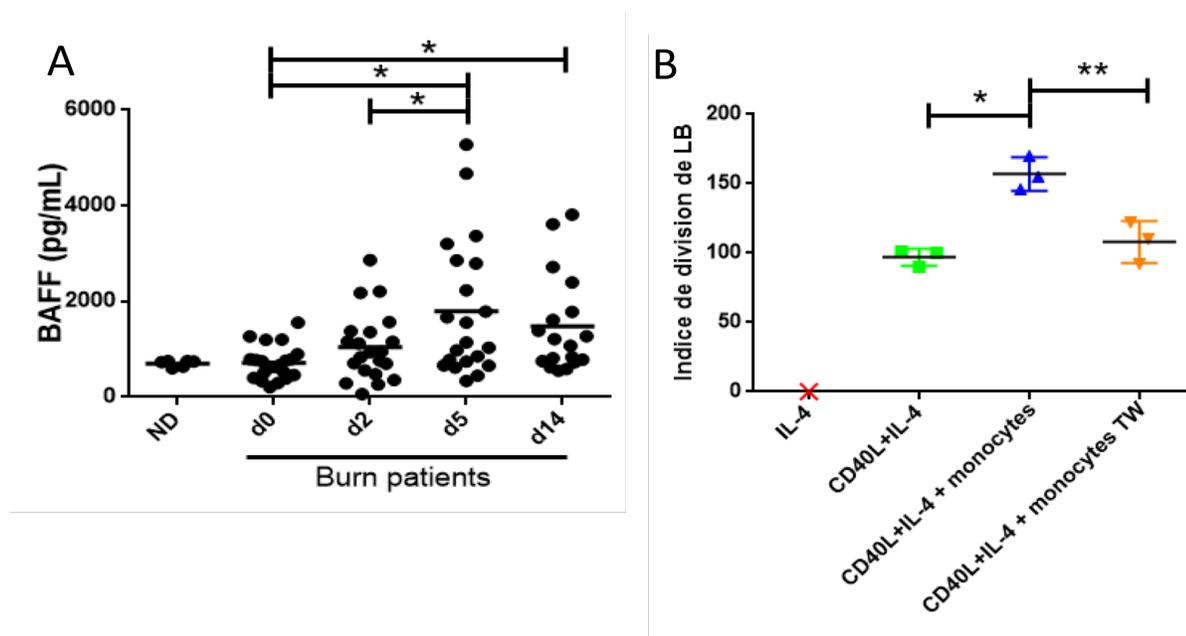


Figure 11. L'augmentation tardive de BAFF soluble *in vivo* et les interactions cellulaires avec les monocytes/macrophages *in vitro* sont associées à une altération des fonctions des LB. A. Représentation *in vivo* de la concentration de BAFF circulant dans le plasma de 21 patients GB. **B.** Représentation *in vitro* de la prolifération de LB en présence de monocytes filtrés avec des pores Transwell de 0.4µm. Les tests statistiques de Friedman et Wilcoxon sont utilisés pour la mesure de BAFF et le test t apparié pour l'expérience Transwell (n=3). TW: Transwell. Les symboles * et** représentent respectivement un $p < 0.05$ et $p < 0.01$.

Dans un deuxième temps, il est important de déterminer si les monocytes/macrophages activent les LB par la production de cytokines ou par des interactions cellulaires directes. D'où l'expérience de Transwell *in vitro* qui évalue la division des LB en co-culture avec des monocytes séparés ou non par des pores. La figure 11B montre qu'une barrière Transwell mène à une division des LB significativement moins élevée que lorsque les monocytes sont en contact direct avec les LB ($p=0,0029$). Donc les monocytes/macrophages nécessitent un mécanisme d'interactions cellulaires afin de stimuler la prolifération des LB.

4.4 L'extraction, la détection et la quantification des bactéries du sang et de la peau.

Dans le but d'étudier les implications potentielles du microbiome du sang et de la peau sur l'immuno-modulation chez les patients GB, il faut tout d'abord mettre au point les techniques d'extraction et de détection de l'ADN 16S bactérien. La figure 12A présente l'optimisation de la technique d'extraction de l'ADN et de quantification des équivalents bactériens par qPCR. Le premier graphique de la figure 12A montre que la méthode d'extraction de l'ADN est fonctionnelle et l'ADN 16S bactérien est clairement détectable et quantifiable par qPCR. Les expériences d'optimisation de la méthode d'extraction révèlent que l'ajout d'une étape de lyse mécanique avec les billes en verre réduit significativement la quantité d'ADN bactérien récoltée ($p=0,0255$). Le deuxième graphique de la figure 12A expérimente l'ajout artificiel d'environ 3900 bactéries *E.coli* dans les échantillons de sang avant l'extraction. L'ajout des bactéries est bel et bien traduit par une plus haute quantité d'équivalents bactériens détectée par qPCR ($p=0,0394$). De plus, l'utilisation de la lyse mécanique avec les billes améliore l'efficacité de l'extraction de l'ADN lorsque la quantité de bactéries est élevée. Un échantillon d'ADN humain purifié et de l'eau stérile ont été utilisés comme contrôles négatifs, mais ne sont pas présentés dans la figure 12A, car ils ne peuvent pas être normalisés par le volume de sang.

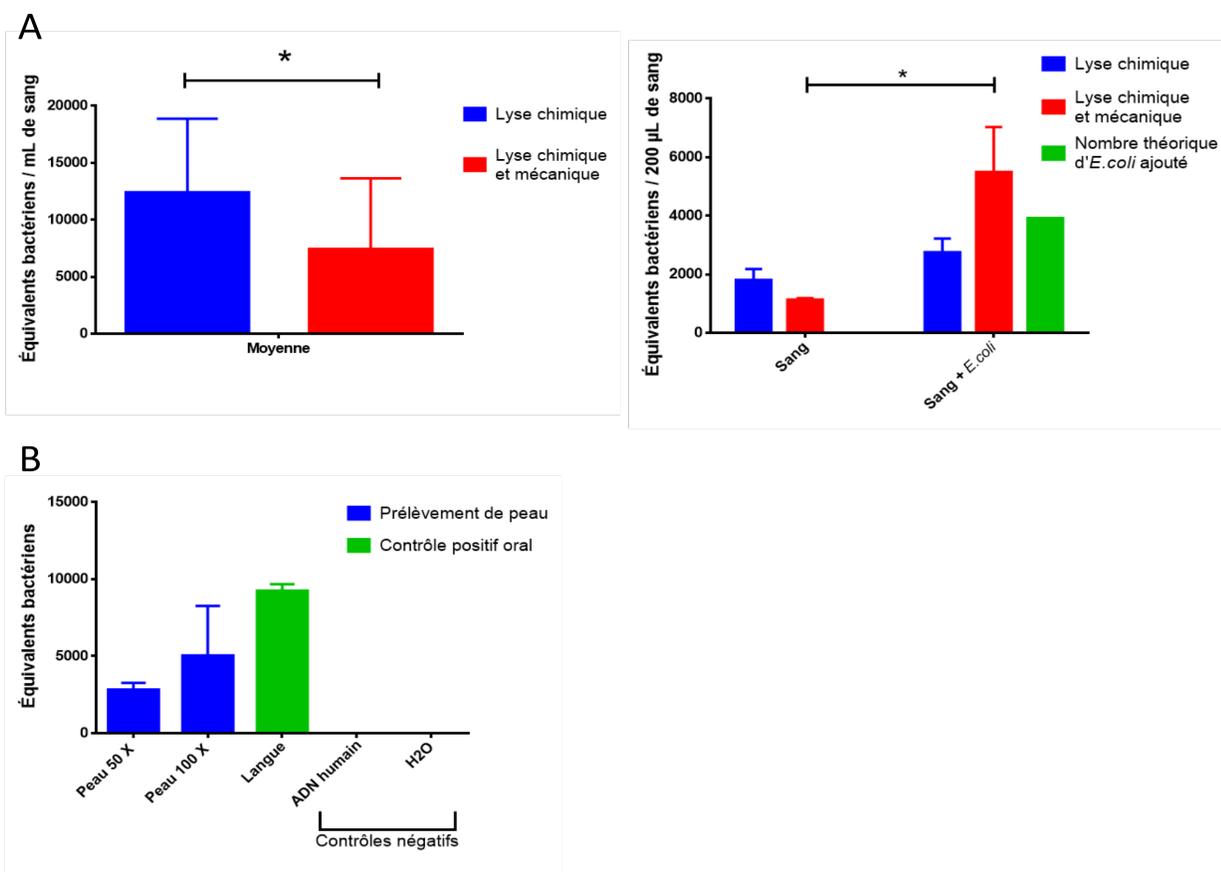


Figure 12. La technique de qPCR permet de détecter l'ADN 16S bactérien à partir du sang et de la peau de sujets sains. L'ADN bactérien est extrait à partir du sang et de la peau de sujets sains et quantifié par qPCR avec l'utilisation d'amorces ciblant l'ADN 16S. La quantité d'ADN bactérien est transposée en équivalents bactériens. Dans le cas du sang, la quantité d'ADN bactérien est reportée en fonction du volume de sang (par 200µL ou par mL). Le test t est utilisé pour comparer deux groupes. **A.** Représentation de la quantité d'ADN bactérien périphérique extrait avec ou sans lyse mécanique par des billes (n=3) et un rajout arbitraire de bactéries *E.coli* (n=1). **B.** Représentation de la quantité d'ADN bactérien extrait à partir des récoltes de peau. 50 X : 50 frottis allés-retours, 100 X: 100 frottis allés-retours. Le symbole * représente un $p < 0.05$.

Dans le but de réaliser des études du microbiome de la peau des patients GB dans le futur, il est nécessaire de s'assurer que les écouvillons et les solutions utilisés permettent de récolter une quantité d'ADN 16S détectable par qPCR. La figure 12B montre que l'ADN bactérien issu de la peau d'un sujet sain est détecté post-extraction. De plus, 100 frottis de la peau semblent récolter plus de bactéries que 50 frottis. La récolte des bactéries de la langue a servi de contrôle positif dans ce test.

4.5 La quantité d'ADN total circulant est modifiée au cours du temps chez les patients GB, mais la quantité d'ADN bactérien n'est pas modifiée.

Suite à la mise au point de la technique d'extraction de l'ADN à partir du sang, il est primordial de quantifier l'ADN total et l'ADN 16S bactérien en circulation chez les patients GB. L'ADN périphérique a été extrait à partir d'échantillons de sang de 4 patients GB. L'ADN total, majoritairement appartenant à l'hôte, est quantifié par spectrophotométrie (Nanodrop). La figure 13A expose d'une part une concentration d'ADN qui semble être à la hausse chez les patients GB par rapport aux sujets sains. D'autre part, la concentration d'ADN total chez les patients a tendance à diminuer au jour 3 (d3) et à remonter plus tard. Le test statistique sur la concentration de l'ADN total des patients au cours du temps exhibe une différence significative globalement ($p=0,0329$).

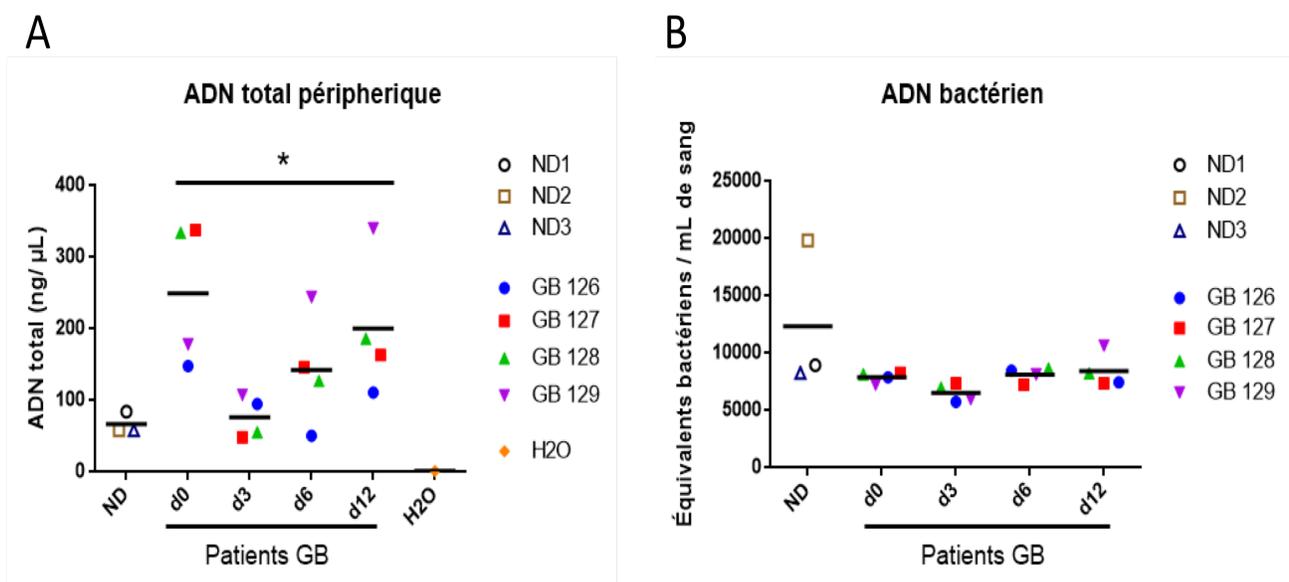


Figure 13. L'ADN total du sang diminue post-brûlures mais le nombre d'équivalents bactériens en circulation n'est pas significativement modifié. L'ADN est extrait à partir du sang de 4 patients GB prélevé à 4 points de temps (d0, d3, d6 et d12). Le test statistique de Friedman est utilisé. **A.** Représentation de l'ADN total extrait du sang des patients GB et quantifié par spectrophotométrie (en ng/ μ L). **B.** Représentation du nombre d'équivalents bactériens du sang de patients GB, quantifié par qPCR avec l'utilisation d'amorces ciblant l'ADN 16S. Le symbole * représente un $p < 0.05$.

À partir des échantillons d'ADN total extrait du sang des 4 patients, l'ADN 16S bactérien est amplifié et quantifié par qPCR. La quantité d'ADN 16S bactérien est transformée en équivalents bactériens par mL de sang. La figure 13B indique que le nombre d'équivalents bactériens en circulation n'est pas modifié au cours du temps chez les patients GB. De plus, il n'y a pas de différence significative des équivalents bactériens entre les patients GB et les donneurs sains.

Chapitre 5. Discussion

5.1 Récapitulatif des résultats obtenus

Les études préliminaires de notre laboratoire ont mis en évidence des altérations importantes du système immunitaire chez les patients GB. Plusieurs modulations de signaux pro- et anti-inflammatoires ont été observées *in vivo*. Ainsi, il est confirmé que l'environnement inflammatoire des patients GB induit de grands changements immunitaires. Un des objectifs principaux de ce projet est de consolider ces observations préliminaires avec un modèle *in vitro* basé surtout sur l'étude des APC. Les manipulations *in vitro*, utilisant le sérum de patients GB (sérum GB), permettent de tester les effets du milieu inflammatoire des patients sur diverses cellules immunitaires provenant de sujets sains. Les séra GB provenant de différents temps post-brûlure (d0, d2, d5 et d14) nous permettent de modéliser *in vitro* les conditions inflammatoires présentes chez les patients GB afin de tester leurs impacts sur le système immunitaire des patients au cours du temps. Nous émettons l'hypothèse que les patients GB sont en hyperinflammation entre d0 et d2, en immunosuppression entre d2 et d5, et enfin dans une phase de restauration du système immunitaire entre d5 et d14. L'utilisation de sérum de donneurs sains (sérum ND) sert de comparatif et permet de mieux représenter les effets uniques du sérum GB. Les patients non-brûlés aux unités des soins intensifs auraient été des meilleures références que les ND vu qu'ils sont exposés au même environnement que les patients GB. Néanmoins, toutes modifications significatives apportées par le sérum GB par rapport au sérum ND pourraient être attribuées aux divers facteurs solubles circulants. Cependant, cette étude ne permet pas de spécifier quelles cytokines/chimiokines sont responsables des changements observés *in vitro*. Il s'agit seulement d'évaluer l'influence du milieu inflammatoire sérique des patients GB dans son ensemble. Notons qu'il peut y avoir des variabilités entre chaque expérience répétée malgré que les cellules proviennent du même donneur sain. Il faut aussi prendre en compte les nombreux paramètres associés à la prise en charge clinique qui peuvent affecter le microenvironnement des patients. Les litres de soluté injectés pour la réanimation diluent le sang et donc influence la concentration des facteurs solubles

périphériques. Par exemple, un individu pesant 70 kg et avec un TBSA de 30%, nécessite plus que 8 litres de liquides en 24h selon la formule de Parkland [12]. De plus, l'administration des antibiotiques, la sédation et le débridement influencent l'état inflammatoire des patients GB. Ainsi, la composition du sérum GB et ses effets potentiels sont associés à ces interventions cliniques en plus des modulations immunologiques naturelles chez les patients.

Nos résultats ont montré que le sérum des patient GB modifie le phénotype des monocytes et inhibe la prolifération des LB, ainsi que leur production d'Ig. Nous avons également observé que les monocytes/macrophages influencent les fonctions des LB via des interactions cellulaires et potentiellement via BAFF qui est à la hausse chez les patients GB. Enfin, nous avons optimisé la méthode d'extraction et de quantification de l'ADN bactérien du sang et de la peau. La quantité d'ADN total périphérique est altérée chez les patients GB, tandis que la quantité d'équivalents bactériens dans le sang est inchangée.

5.2 L'environnement inflammatoire des patients GB altère la différenciation des monocytes mais n'affecte pas la polarisation des macrophages.

L'augmentation des niveaux d'IL-1 β , IL-6, IL-8 et IL-10 *in vivo* peut possiblement engendrer des altérations majeures des APC de l'immunité innée, dont les monocytes et les macrophages. Comme le montre la figure 6, la sous-population majoritaire de monocyte dans un milieu sain est le monocyte classique. Cette observation concorde avec la littérature qui confirme le sous-type classique comme étant le profil le plus prédominant [70, 82]. Cependant, en présence de sérum GB à d2, il y a une augmentation significative du pourcentage des monocytes intermédiaires et une diminution significative des monocytes classiques. Ce résultat est obtenu après 24h et 48h d'incubation avec le sérum GB. L'augmentation des monocytes intermédiaires *in vitro* est associée à une augmentation des monocytes non-classiques *in vivo* selon nos résultats préliminaires. Certaines études proposent que la population intermédiaire corresponde à

une population transitoire entre le profil classique et le profil non-classique qui est le plus différencié. Dans ce cas, nos résultats suggèrent que le milieu reflétant l'environnement inflammatoire des patients GB entraîne une maturation des monocytes. En outre, des études ont déjà établi que les monocytes intermédiaires secrètent des médiateurs pro-inflammatoires tels qu'IL-1 β et IL-8, ainsi que des signaux anti-inflammatoires comme IL-10. Donc, l'augmentation des monocytes intermédiaires en présence de sérum GB *in vitro* (figure 6), est associée à l'augmentation des niveaux de signaux pro-inflammatoires et anti-inflammatoires observés par notre laboratoire *in vivo*. Finalement, ce résultat corrobore d'autres études qui ont établi l'implication importante des monocytes intermédiaires dans divers pathologies inflammatoires [281].

Ensuite, nous avons testé l'effet du sérum des patients GB sur l'activation et la différenciation des macrophages. Le but était de voir si le sérum GB favorise la polarisation des macrophages au profil M2 anti-inflammatoire qui participerait potentiellement à l'immunosuppression. En se basant sur la littérature, nous présumons que la majorité des monocytes se différencient en macrophages après 6 jours de culture en total [282]. L'étude de la polarisation des macrophages en M1/M2 est évaluée avec l'expression des marqueurs de surface CD206, CD23 et CD80. Nos résultats (figure 7) montrent que l'environnement inflammatoire présent dans les séra des patients GB ne modifie pas significativement l'expression de ces molécules de surface sur les macrophages par rapport au contrôle sérum ND. Selon les résultats préliminaires *in vivo* obtenus par notre laboratoire, il y a une augmentation d'IL-4 et de MFG-E8 sérique, des molécules capables de promouvoir les macrophages M2 (figure 4B). Malgré cette hausse d'IL-4 et de MFG-E8 en périphérie, les observations *in vitro* indiquent que le sérum GB n'est pas suffisant pour induire des altérations majeures du phénotype des macrophages. En outre, nous avons tenté d'ajouter différentes concentrations de MFG-E8 humain recombinant aux macrophages *in vitro* (données non montrées). Cependant, aucune modifications n'ont été apportées par rapport aux résultats de la figure 7. Il aurait été intéressant d'ajuster les expériences pour que les monocytes/macrophages soient cultivés avec du sérum GB tout au long des 6 jours au lieu des derniers 24 heures seulement. Il aurait aussi été pertinent d'évaluer d'autres marqueurs des macrophages M2 comme CD163.

5.3 Le milieu inflammatoire sérique des patients GB n'altère pas l'expression de CD40L par les LT.

Notre laboratoire avait déjà observé une diminution dramatique du sCD40L circulant chez 22 patients GB (figure 5A). Le sCD40L est une molécule d'intérêt dans ce projet car il active diverses fonctions des APCs en se liant au CD40 de surface. Ainsi, le but était de tester si le milieu inflammatoire périphérique (sérique) des patients GB inhibe l'activité des LT, les principaux producteurs de sCD40L. L'étude de la modulation des LT par les séra des patients permettrait de mieux comprendre la dérégulation des APC vue *in vivo*, en particulier les LB. Les résultats *in vitro* (figure 8) montrent que le sérum des patients GB ne modifie pas significativement l'expression de CD40L, ni la sécrétion de sCD40L en surnageant par rapport au sérum contrôle ND. Ces observations *in vitro* suggèrent que la composition sérique des patients GB n'est pas directement associée à la diminution du sCD40L observée *in vivo*. Donc il est possiblement causé plutôt par des interactions cellulaires, notamment l'action du récepteur CTLA-4 des Tregs qui empêche l'activation des LT via CD28 par exemple [283]. Il se peut aussi que l'activation des LT par OKT3 et IL-2 *in vitro* soit trop puissante, submergeant ainsi les effets potentiellement inhibiteurs du sérum GB. La chute de la concentration du sCD40L chez les patients peut aussi être tout simplement causée par la dilution massive du sang avec le processus de réanimation. Notons aussi qu'il existe d'autres producteurs de sCD40L comme les plaquettes qui pourrait possiblement être dérégulées *in vivo* [284]. Suite à l'activation des plaquettes, elles expriment en quelques secondes une grande quantité de CD40L, surtout durant la formation des thromboses [285]. Cependant, une étude conclut que les plaquettes sanguines ne sont pas hyperactivées chez les GB et leur fonctionnalité n'est pas dérégulée d'une façon majeure [286]. Les monocytes, macrophages, DC, NK, mastocytes, basophiles et éosinophiles peuvent aussi exprimer un certain niveau de CD40L fonctionnel dans différents conditions pathologiques ou suite à une stimulation par certaines cytokines [287-291]. Néanmoins, plus d'études sont nécessaires pour déterminer avec certitude les causes derrière la dépression des niveaux de sCD40L chez les patients GB.

5.4 L'environnement inflammatoire des patients GB et les monocytes/macrophages altèrent les fonctions des LB

Nos résultats préliminaires avaient démontré une dérégulation de la différenciation des LB ainsi qu'une déficience d'Ig chez les patients *in vivo* (figure 5B). Ces altérations sont couplées à des modulations mixtes des signaux activateurs des LB, dont IL-6 qui augmente et sCD40L qui diminue. Toutefois, le potentiel de division des LB n'a pas été examiné chez les patients GB. Dans la figure 9, le groupe contrôle avec le sérum ND montre que les LB ne se multiplient pas avec IL-4 seul, mais prolifèrent fortement avec la combinaison d'IL-4 et sCD40L. Les effets anti-apoptotiques et stimulateurs d'IL-4 et sCD40L sur les LB sont bien documentés. Selon la courbe dose-réponse du sCD40L et la prolifération des LB (figure S1), la concentration de sCD40L rajouté dans nos expériences (10% du volume) est excessive et induit une stimulation maximale. En outre, la co-culture des LB avec des monocytes/macrophages autologues amplifient considérablement la prolifération des LB d'une façon dépendante de sCD40L. Il est possible que le sCD40L active les monocytes et les macrophages via leurs récepteurs CD40, ce qui mène à la sécrétion d'IL-6 et une réponse positive pour la prolifération des LB [129]. Sachant que les monocytes se différencient en macrophages durant les 6 jours d'incubation, nous ne savons pas si la stimulation de la prolifération des LB est initiée par les monocytes, les macrophages ou les deux. Selon nos connaissances, aucune autre étude n'a démontré ce phénomène médié par les monocytes et/ou les macrophages. Toutefois, certaines études ont montré que les macrophages répriment via IL-10 la prolifération des LB activés par la voie BCR et TLR-4 mais n'inhibent pas les LB activés par la voie CD40 [292]. D'autres études ont observé un pouvoir des mastocytes à stimuler la prolifération des LB en sécrétant IL-6 et en augmentant l'expression de CD40 en surface des LB, ce qui amplifie la signalisation CD40L-CD40 [293]. Il est possible que les monocytes/macrophages dans notre cas agissent de la même façon pour accroître la signalisation CD40-CD40L chez les LB, conduisant à une augmentation de la division. Cependant, en présence de sérum GB, la prolifération des LB *in vitro* est significativement réduite et ceci est partiellement corrigé par la présence de

monocytes/macrophages (figure 9). Ainsi, la composition du sérum des patients GB inhibe l'activation des LB par IL-4 et sCD40L. Puisque que l'activation des LB par la voie CD40 est déjà saturée par le rajout de 10% de sCD40L, cette inhibition de la prolifération ne peut pas être causée par les faibles concentrations de sCD40L sérique chez les patients GB. Malgré les hauts niveaux d'IL-6 circulants chez les patients GB, ils existent probablement d'autres facteurs solubles immunosuppresseurs qui limitent la multiplication des LB. Après tout, cette prolifération réduite des LB *in vitro* est associée à une dérégulation de la maturation des LB et une diminution des niveaux d'anticorps circulants *in vivo* déjà observées par notre laboratoire (figure 5B).

Après avoir étudié la prolifération des LB dans un milieu reflétant l'environnement inflammatoire de patients GB, nous avons examiné leur production des anticorps IgA, IgG et IgM. Premièrement, la figure 10 révèle que le sérum de patients GB réduit significativement la production d'IgA, IgG et IgM par les LB par rapport au contrôle sérum ND. Ce résultat concorde avec nos études préliminaires *in vivo*, ainsi que d'autres études, qui confirment une dépression des concentrations d'Ig chez les patients GB [228, 230, 231]. Ainsi la composition sérique des patients GB inhibe plusieurs fonctions des LB incluant la prolifération, la différenciation et la production d'anticorps. Une telle altération contribue à l'immunosuppression et limite l'immunité humorale et la défense contre les pathogènes extracellulaires chez les patients GB. La figure 10 montre deuxièmement que la stimulation des LB par sCD40L n'augmente pas significativement la sécrétion d'IgA et IgG par rapport aux conditions avec IL-4 seul. Cette observation inattendue s'oppose à la majorité des études qui décrivent la capacité de CD40L à stimuler la différenciation des LB et la transition de l'isotope IgM en IgA et IgG [128, 294]. Enfin, la figure 10 montre aussi que la présence de monocytes/macrophages atténue significativement la production d'Ig par les LB malgré leur effet stimulateur de la prolifération. Ce phénomène observé concorde avec d'autres études qui ont également démontré l'action suppressive des monocytes sur la production d'Ig par les LB [295, 296]. Une des études rajoute que cette action n'est pas due à une digestion des Ig par les monocytes [295]. Nos résultats pourraient suggérer que la prolifération et la différenciation des LB sont induites par différents voies de signalisation intracellulaire.

Les monocytes/macrophages semblent stimuler la division des LB, tout en inhibant leur différenciation et leur production d'Ig.

Nos résultats sur l'influence des monocytes/macrophages sur les fonctions des LB nous a poussé à explorer par quel moyens ces interactions sont possibles. Nous avons envisagé l'étude de BAFF, une molécule produite par les monocytes et les macrophages, et connue pour sa capacité à activer les LB. Ainsi, dans le but de mieux comprendre le rôle des monocytes et des macrophages dans la dérégulation des LB *in vivo*, la concentration de BAFF dans le plasma de 21 patients GB a été mesurée. La figure 11a démontre une augmentation relativement tardive de BAFF soluble au 5^{ème} jour post-brûlure. Cette augmentation attardée de BAFF est associée à une maturation tardive des LB chez les patients GB. Ainsi, il est possible que les monocytes et les macrophages soient impliqués dans la normalisation de la différenciation des LB et de la production d'Ig *in vivo* par l'intermédiaire de BAFF. En effet, plusieurs études ont prouvé que BAFF favorise la formation de plasmocytes et la production d'Ig [176-178]. Il est aussi possible que BAFF soit impliqué dans la prolifération accrue des LB cultivés avec les monocytes et les macrophages *in vitro*.

C'est ainsi qu'il est devenu important de déterminer si les monocytes/macrophages stimulent la prolifération des LB via des médiateurs solubles ou via des interactions cellulaires directes. Ainsi, des LB stimulés par IL-4 et CD40L, ont été mis en co-culture avec des monocytes, mais cette fois les deux populations sont séparées par des pores d'une dimension de 0.4 μ M. Ces pores permettent le passage des cytokines secrétées par les monocytes et les macrophages mais empêchent un contact physique avec les LB. Cette expérience Transwell (figure 11b) montre que les monocytes/macrophages agissent via des interactions cellulaires afin de stimuler la prolifération des LB. Notons que cette observation n'exclut pas le rôle potentiel des cytokines produites par les monocytes/macrophages. Donc, il est toujours possible qu'une combinaison de facteurs solubles et d'interactions cellulaires avec les LB soient essentielles. Néanmoins, la nécessité des interactions cellulaires pour augmenter la prolifération des LB mène à la question suivante: quels récepteurs et/ou ligands de surfaces pourraient médier un tel mécanisme? Selon nos connaissances, il n'existe pas d'études qui décrivent un contact cellulaire avec les monocytes/macrophages activant spécifiquement la prolifération des

LB. Certes d'autres interactions cellulaires entre ces leucocytes sont documentées comme le transfert d'antigènes entre les macrophages et les LB [297, 298]. Cependant, ce type de contact n'est pas applicable dans nos expériences *in vitro*. Une étude a prouvé la capacité des mastocytes à promouvoir la prolifération des LB, en partie via des interactions cellulaires pas bien définis [293]. Cette étude suggère que les mastocytes font augmenter l'expression de CD40 sur la surface des LB. Cette théorie pourrait possiblement expliquer la stimulation de la prolifération des LB par les monocytes/macrophages qui se fait d'une façon CD40L-dépendante. Il serait intéressant d'explorer davantage les potentiels mécanismes de contact physique entre les monocytes/macrophages et les LB, ainsi que la possibilité d'exploiter ces interactions pour corriger l'activité des LB chez les patients GB.

5.5 La mise au point des techniques d'extraction et de quantification de l'ADN bactérien du sang et de la peau

En plus des études du microenvironnement immunologique des patients GB, nous nous intéressons à l'implication du microbiome sur l'immuno-modulation chez les patients GB. Plusieurs études ont déjà mis en évidence une dysbiose intestinale et dermatologique chez les patients GB. Cependant, aucune étude n'a caractérisé le microbiome sanguin chez les patients GB et son implication dans la modulation inflammatoire. L'augmentation de la perméabilité épidermique et intestinale, ainsi que le sepsis observées chez les patients GB suggèrent la possibilité d'altérations majeures du microbiome périphérique. Notre objectif est d'évaluer la quantité de bactéries dans le sang et sur la peau des patients GB. Pour ce faire, il est primordial de mettre au point les techniques d'extraction et de quantification de l'ADN bactérien. En collaboration avec le laboratoire de Dr Jennifer Wargo localisée aux États-Unis, notre laboratoire a déjà développé une technique de qPCR qui permet la détection de l'ADN 16S bactérien issu de fragments de tumeur. Dans le présent projet, nous nous sommes basés sur cette technique de qPCR pour voir si elle s'applique à l'ADN bactérien présent dans le sang et sur la peau. Ainsi, les amorces, la courbe standard et le modèle d'équivalence bactérienne

utilisés et établies par nos collaborateurs sont les mêmes dans ce projet. Les équivalents bactériens correspondent à une unité d'estimation du nombre de bactéries à partir de la quantité d'ADN 16S si hypothétiquement toutes les bactéries étaient des *E.coli*. En réalité, il existe des bactéries autres qu'*E.coli* qui détiennent différents nombres de copies de l'ADN 16S dans leur génome.

L'optimisation de l'extraction de l'ADN sanguin est passée par des essais de plusieurs trousse d'extraction et protocoles différents qui ne sont pas représentés dans cet œuvre. La figure 12 correspond aux résultats obtenus avec l'utilisation de la trousse et du protocole d'extraction optimaux. La figure 12A révèle que l'extraction de l'ADN sanguin de donneurs sains est réussite et l'ADN 16S bactérien est en effet détectable et quantifiable par qPCR. Notons que la présence d'ADN bactérien en périphérie ne constitue pas une preuve en soi d'une présence de bactéries vivantes. Il est possible que les bactéries soient déjà mortes et que l'ADN 16S circulant soit en voie d'être éliminé par le système immunitaire. Néanmoins, la détection d'ADN bactérien permet de contester l'idée que le sang est un environnement stérile. Le protocole d'extraction de l'ADN du sang est testé avec et sans lyse mécanique avec des billes en verre. D'autres études ont obtenu un meilleur rendement d'acides nucléiques avec l'utilisation de lyse avec les billes [299, 300]. Les billes permettent théoriquement une rupture efficace des membranes des bactéries gram +, ce qui libère l'ADN bactérien et augmente le rendement obtenu. Cependant, nous remarquons dans notre étude (figure 12A) que le rendement de l'ADN bactérien du sang est significativement réduit avec le rajout de l'étape de lyse mécanique. Il est possible que l'ADN adhère sur les billes, causant une perte durant l'extraction. Toutefois, lorsque nous rajoutons artificiellement des bactéries *E.coli* dans le sang, la lyse mécanique aide à récupérer plus d'ADN bactérien alors que la lyse chimique seule n'est pas suffisante. Ainsi, les billes semblent mener à plus de pertes pour les échantillons avec une quantité de bactéries relativement faible. Or dans le cas d'un plus grand nombre de bactéries, l'utilisation des billes apportent plus de gains que de pertes. Étant donné que certains patients GB présentent une bactériémie, l'utilisation de la lyse mécanique durant l'extraction de l'ADN pourrait être optimale dans ce cas.

Des études ont déjà mis en évidence une dysbiose de la peau chez les patients GB, ce qui est associée aux infections de la peau, la pneumonie et le sepsis [274]. Notre laboratoire a

des plans dans le futur pour évaluer l'altération de la diversité bactérienne sur la peau et comment elle influence l'état inflammatoire des patients GB. Ainsi, il est important de s'assurer que le matériel utilisé pour la récolte des bactéries de la peau et l'extraction de l'ADN par génome Québec soit fonctionnel. Les écouvillons et la solution de stabilisation du microbiome de type P-117 sont des prototypes. Ainsi leur efficacité à prélever et maintenir l'intégrité de l'ADN bactérien de la peau n'avait pas encore été établi. La figure 12B montre que l'ADN bactérien issu de la peau de sujets sains est détectable par qPCR. Des frottis de 100 allers-retours semblent récolter modérément plus de bactéries que 50 allers-retours. Sachant que les écouvillons et la solution de stabilisation P-117 fonctionnent bien, il serait intéressant d'étudier le microbiome de la peau des patients GB et son impact sur l'immuno-modulation. Le défi des cultures de peau serait les facteurs variables entre les patients GB tels que les sites de brûlures, niveau d'inconfort aux frottis et le changement des pansements.

5.6 La concentration d'ADN total périphérique est modifiée au cours du temps chez les patients GB, mais le nombre d'équivalents bactériens n'est pas altéré.

Après avoir vérifié que nos techniques permettent de détecter et de quantifier l'ADN bactérien issu du sang, l'étape prochaine est d'évaluer la quantité d'ADN total et d'équivalents bactériens en circulation chez 4 patients GB au cours du temps. L'ADN total comprend majoritairement du matériel génétique de l'hôte. La figure 13A révèle que les niveaux d'ADN total circulant sont généralement plus élevés chez les patients GB que les sujets sains. Cependant, la concentration d'ADN total chute chez les patients GB au jour 3 (d3). Cette diminution d'acides nucléiques est possiblement influencée par la dilution du sang causée par les litres de liquides injectés durant la prise en charge clinique. L'immunosuppression au troisième jour peut aussi mener à une déplétion des PBMC, notamment la lymphopénie [214-216], conduisant à une diminution de l'ADN

total dans le sang. Plus d'études sont requises pour identifier les causes derrière cette chute de l'ADN total périphérique chez les patients GB.

La figure 13B révèle que la quantité d'équivalents bactériens dans le sang des patients GB n'est pas significativement modifiée par rapport aux sujets sains. De plus, la quantité d'ADN 16S bactérien n'est pas modulée significativement au cours du temps. Cependant, une quantité de bactéries inchangée ne signifie pas que la diversité bactérienne ne soit pas altérée. Il serait intéressant de poursuivre cette étude avec le séquençage des échantillons d'ADN du sang. L'identification des espèces bactériennes dans le sang, surtout celles normalement en prévalence dans l'intestin, permettrait de situer l'augmentation de la perméabilité intestinale dans le temps chez les patients GB. En outre, la connaissance de la composition du microbiome sanguin permettrait d'effectuer des études de corrélation avec la modulation du système immunitaire, les types d'infections, le pronostic et la survie des patients. Dans ce cas, il serait possible de cibler les souches bactériennes néfastes et promouvoir les bactéries bénéficiaires aux patients GB.

Chapitre 6. Conclusions

Malgré les améliorations des traitements et de la survie des patients GB ces dernières décennies, l'immunosuppression et les infections nosocomiales mortelles restent difficiles à gérer chez cette population. Notre laboratoire, ainsi que d'autres, avaient déjà observé des altérations anormales des cellules immunitaires et des niveaux de facteurs immunologiques solubles chez les patients GB. Cependant, la séquence exacte de l'altération des leucocytes et les interactions potentielles entre les différentes cellules immunitaires sont inconnues. Ce projet se base sur les découvertes antérieures pour examiner encore plus loin la complexité de l'état inflammatoire des patients GB. Ce projet est divisé en deux volets. Le premier évalue les effets du milieu immunologique associé aux patients GB, en particulier les APC. La deuxième partie effectue une mise au point des techniques d'analyse du microbiome du sang et de la peau afin d'étudier dans l'avenir l'impact du microbiome sur l'immunosuppression chez les patients GB.

Le but principal de la première partie du projet était de tester l'effet du sérum de patients GB sur les APC de donneurs sains dans un modèle *in vitro*. Premièrement, nous avons démontré que le sérum des patients GB entraîne la différenciation des monocytes vers un profil intermédiaire capable de produire des signaux pro-inflammatoires tel IL-1 β et des signaux anti-inflammatoires tel IL-10. Ce résultat est associé à une augmentation des monocytes non-classiques et des niveaux d'IL-1 β et IL-10 *in vivo* d'après nos études préliminaires et la littérature. Par contre le sérum des patients GB n'altère pas le phénotype des macrophages *in vitro* et donc semble ne pas influencer leur polarisation en M1/M2. De plus, les séras des patients n'ont pas inhibé la capacité des LT *in vitro* à exprimer CD40L, une molécule indispensable à l'activation des APC. Cette observation indique que la diminution de sCD40L vu préalablement *in vivo* chez les patients, est possiblement induite par des éléments autres que les facteurs solubles en circulation. Cependant, le sérum des patients GB réduit la prolifération des LB et leur sécrétion d'IgA, IgG et IgM *in vitro*. Ce résultat concorde avec les résultats préliminaires de notre laboratoire qui montrent une dérégulation des LB et une diminution des anticorps circulant chez les patients GB. La co-culture des LB avec des monocytes/macrophages *in*

in vitro permet de corriger partiellement la prolifération des LB, mais réduit davantage la sécrétion d'Ig. Ce résultat révèle la présence d'interactions importantes entre ces populations cellulaires qui sont peu documentées dans la littérature. Suite à cette observation, nous avons rajouté un objectif dans le projet qui vise à mieux comprendre quel type d'interactions existe entre les LB et les monocytes/macrophages. Avec les expériences Transwell, nous avons établis que les monocytes/macrophages stimulent la prolifération des LB par des interactions cellulaires directes. Nous avons aussi investigué BAFF, une molécule produite par les monocytes et les macrophages, qui stimulent les fonctions des LB. Nous avons observé que les niveaux de BAFF augmentent relativement tard au jour 5 et ceci est associé à une maturation tardive des LB chez les patients GB. La figure 14 ci-dessous présente la trajectoire immunologique globale des patients GB selon les observations *in vivo* et *in vitro* de la littérature et de notre laboratoire. La figure montre comment l'hyperactivation précoce des monocytes/macrophages et leur production accrue d'IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 et MFG-E8 mènent à un épuisement du système immunitaire. Cet épuisement vient sous la forme d'une répression des niveaux de sCD40L et d'Ig circulants, ainsi qu'une prolifération inhibée des LB. Après environ deux semaines, le système immunitaire des patients GB regagne sa fonctionnalité. L'augmentation tardive des niveaux d'IL-7, sCD40L et BAFF sont associés à une maturation des LB et une augmentation des niveaux d'Ig périphériques.

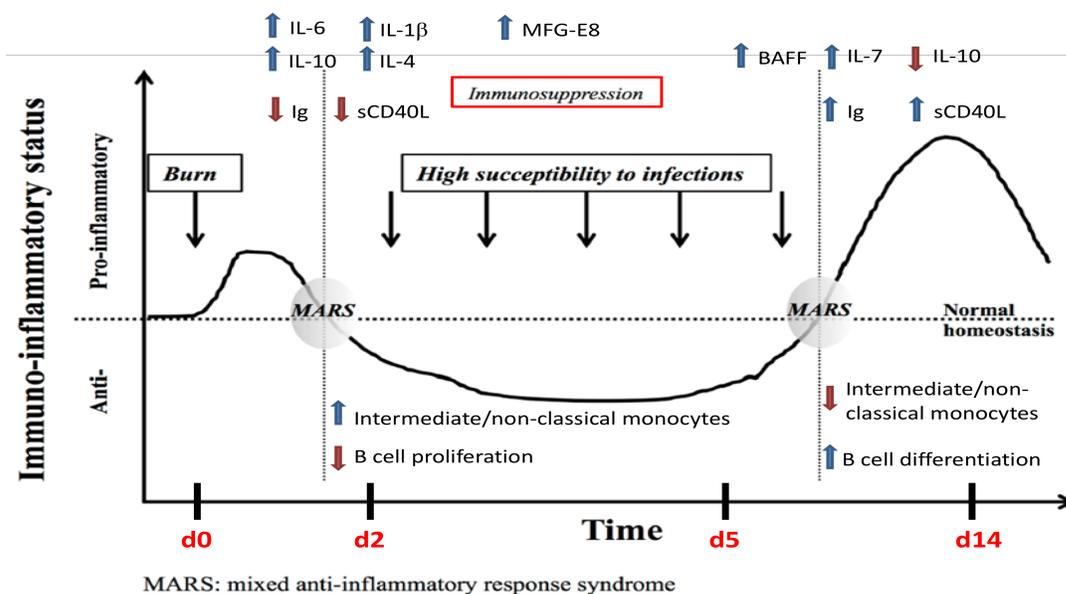


Figure 14. La trajectoire immunologique des patients GB à travers le temps.

La deuxième partie du projet avait comme premier objectif d'optimiser les techniques d'extraction et de détection de l'ADN bactérien du sang et de la peau. Nous avons réussi à extraire et quantifier l'ADN bactérien du sang par qPCR. La récolte des bactéries de la peau fonctionne bien et l'ADN bactérien est détectable par qPCR. La mise au point de ces techniques permet d'évaluer le microbiome des patients GB. Dans ce projet, nous avons uniquement examiné la quantité d'ADN total et d'ADN 16S bactérien dans le sang de 4 patients GB. La concentration d'ADN total en circulation semble généralement élevée, mais elle chute au jour 3, possiblement due à la leucopénie et à la dilution du sang par le processus de réanimation. Le nombre d'équivalents bactériens dans le sang des patients GB ne sont pas significativement modifiés. Dans l'avenir, il serait intéressant de suivre cette étude avec le séquençage du microbiome du sang et de la peau des patients.

Notre étude suggère que le ciblage des facteurs associés aux LB en particulier pourrait avoir des bénéfices cliniques aux patients GB. Nous proposons que le maintien d'un niveau élevé de sCD40L circulant puisse sauver l'immunité humorale en tant qu'une ligne de défense indispensable contre les infections. Notre étude a également montré que la stimulation des LB par les monocytes/macrophages est sCD40L-dépendante. Donc le maintien d'une concentration de sCD40L assez élevée pourrait également faire participer les monocytes et les macrophages dans le renforcement de l'immunité humorale. Ainsi, une immunothérapie précoce qui restore les niveaux de sCD40L, ainsi que BAFF et IL-7 pourrait au moins affaiblir l'immunosuppression chez les patients GB.

En conclusion, ce projet a établi que le microenvironnement inflammatoire des patients GB altère les APC et favorise un état d'immunosuppression. Les monocytes et les macrophages semblent jouer un rôle important dans la régulation de l'activité des LB, ce qui pourrait rentrer en jeu dans l'immuno-modulation chez les patients GB. Nos techniques d'analyse du microbiome sont mises au point et ouvre la porte à des études futures du microbiome du sang et de la peau des patients GB. À long terme, ce projet pourrait aider à définir des voies immunologiques qui pourraient être modulées par diverses immunothérapies afin de restaurer l'homéostasie inflammatoire et prévenir les infections chez les patients grands brûlés. Avec l'étude du microbiome, ce projet permettra aussi le développement d'immunothérapies adaptées à la présence et au rôle des bactéries dans la modulation du système immunitaire des patients grands brûlés.

Bibliographie

1. Organization WH: **Burns fact sheet**. 2018.
2. Mock C PM, Peden M, Krug E: **A WHO plan for burn prevention and care**. 2008.
3. Peck M, Molnar J, Swart D: **A global plan for burn prevention and care**. *Bulletin of the World Health Organization* 2009, **87**(10):802-803.
4. Joseph K, Trehan A, Cherian M, Kelley E, Watters DA: **Assessment of Acute Burn Management in 32 Low- and Middle-Income Countries**. *World journal of surgery* 2016, **40**(4):791-800.
5. Forjuoh SN: **Burns in low- and middle-income countries: a review of available literature on descriptive epidemiology, risk factors, treatment, and prevention**. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 2006, **32**(5):529-537.
6. Nielson CB, Duethman NC, Howard JM, Moncure M, Wood JG: **Burns: Pathophysiology of Systemic Complications and Current Management**. *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association* 2017, **38**(1):e469-e481.
7. **Rapport annuel 2016-2017**. In.: La Fondation des pompiers du Québec pour les grands brûlés.
8. Valvis SM, Waithman J, Wood FM, Fear MW, Fear VS: **The Immune Response to Skin Trauma Is Dependent on the Etiology of Injury in a Mouse Model of Burn and Excision**. *The Journal of investigative dermatology* 2015, **135**(8):2119-2128.
9. Muller MJ, Pegg SP, Rule MR: **Determinants of death following burn injury**. *The British journal of surgery* 2001, **88**(4):583-587.
10. DeKoning EP: **Thermal Burns**. In: *Tintinalli's Emergency Medicine: A Comprehensive Study Guide, 8e*. edn. Edited by Tintinalli JE, Stapczynski JS, Ma OJ, Yealy DM, Meckler GD, Cline DM. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2016.
11. Devgan L, Bhat S, Aylward S, Spence RJ: **Modalities for the assessment of burn wound depth**. *Journal of burns and wounds* 2006, **5**:e2.
12. Hettiaratchy S, Papini R: **Initial management of a major burn: II--assessment and resuscitation**. *Bmj* 2004, **329**(7457):101-103.
13. Butz DR, Collier Z, O'Connor A, Magdziak M, Gottlieb LJ: **Is palmar surface area a reliable tool to estimate burn surface areas in obese patients?** *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association* 2015, **36**(1):87-91.
14. **Brûlures** [<http://santecheznous.com/condition/getcondition/brulures>]
15. **Traitement brulures Tunisie** [<https://www.medespoir.ca/traitement-brulures-tunisie/>]
16. Hettiaratchy S, Dziewulski P: **ABC of burns: pathophysiology and types of burns**. *Bmj* 2004, **328**(7453):1427-1429.
17. Haberal M, Sakallioglu Abali AE, Karakayali H: **Fluid management in major burn injuries**. *Indian journal of plastic surgery : official publication of the Association of Plastic Surgeons of India* 2010, **43**(Suppl):S29-36.
18. Wurzer P, Culnan D, Cancio LC, Kramer GC: **Pathophysiology of Burn Shock and Burn Edema**. Elsevier; 2018.
19. Lund T, Onarheim H, Reed RK: **Pathogenesis of edema formation in burn injuries**. *World journal of surgery* 1992, **16**(1):2-9.
20. Parihar A, Parihar MS, Milner S, Bhat S: **Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury**. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 2008, **34**(1):6-17.

21. Ward PA, Till GO: **Pathophysiologic events related to thermal injury of skin.** *The Journal of trauma* 1990, **30**(12 Suppl):S75-79.
22. Rawlingson A: **Nitric oxide, inflammation and acute burn injury.** *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 2003, **29**(7):631-640.
23. Lindblom L, Cassuto J, Yregard L, Mattsson U, Tarnow P, Sinclair R: **Importance of nitric oxide in the regulation of burn oedema, proteinuria and urine output.** *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 2000, **26**(1):13-17.
24. Greenhalgh DG, Saffle JR, Holmes JHT, Gamelli RL, Palmieri TL, Horton JW, Tompkins RG, Traber DL, Mozingo DW, Deitch EA *et al*: **American Burn Association consensus conference to define sepsis and infection in burns.** *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association* 2007, **28**(6):776-790.
25. Williams FN, Jeschke MG, Chinkes DL, Suman OE, Branski LK, Herndon DN: **Modulation of the hypermetabolic response to trauma: temperature, nutrition, and drugs.** *Journal of the American College of Surgeons* 2009, **208**(4):489-502.
26. Lundy JB, Chung KK, Pamplin JC, Ainsworth CR, Jeng JC, Friedman BC: **Update on Severe Burn Management for the Intensivist.** *Journal of intensive care medicine* 2016, **31**(8):499-510.
27. Kravitz M: **Immune consequences of burn injury.** *AACN clinical issues in critical care nursing* 1993, **4**(2):399-413.
28. D'Avignon LC, Hogan BK, Murray CK, Loo FL, Hospenthal DR, Cancio LC, Kim SH, Renz EM, Barillo D, Holcomb JB *et al*: **Contribution of bacterial and viral infections to attributable mortality in patients with severe burns: an autopsy series.** *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 2010, **36**(6):773-779.
29. Fikrig SM, Karl SC, Suntharalingam K: **Neutrophil chemotaxis in patients with burns.** *Ann Surg* 1977, **186**(6):746-748.
30. McManus AT, Moody EE, Mason AD: **Bacterial motility: a component in experimental Pseudomonas aeruginosa burn wound sepsis.** *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 1980, **6**(4):235-239.
31. Cancio L, Howard P, AT McManus, Kim S, Goodwin C, Pruitt B: **Burn wound infections;** 2001.
32. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R: **Burn wound infections.** *Clinical microbiology reviews* 2006, **19**(2):403-434.
33. Mayhall CG: **The epidemiology of burn wound infections: then and now.** *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2003, **37**(4):543-550.
34. Pruitt BA, Jr., McManus AT, Kim SH, Goodwin CW: **Burn wound infections: current status.** *World journal of surgery* 1998, **22**(2):135-145.
35. Rue LW, 3rd, Cioffi WG, Mason AD, Jr., McManus WF, Pruitt BA, Jr.: **The risk of pneumonia in thermally injured patients requiring ventilatory support.** *The Journal of burn care & rehabilitation* 1995, **16**(3 Pt 1):262-268.
36. Williams FN, Herndon DN, Hawkins HK, Lee JO, Cox RA, Kulp GA, Finnerty CC, Chinkes DL, Jeschke MG: **The leading causes of death after burn injury in a single pediatric burn center.** *Critical care* 2009, **13**(6):R183.
37. Butler KL, Ambravaneswaran V, Agrawal N, Bilodeau M, Toner M, Tompkins RG, Fagan S, Irimia D: **Burn injury reduces neutrophil directional migration speed in microfluidic devices.** *PLoS one* 2010, **5**(7):e11921.

38. Gillespie P, Siddiqui H, Clarke J: **Cannula related suppurative thrombophlebitis in the burned patient.** *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 2000, **26**(2):200-204.
39. Pruitt BA, Jr., McManus WF, Kim SH, Treat RC: **Diagnosis and treatment of cannula-related intravenous sepsis in burn patients.** *Annals of surgery* 1980, **191**(5):546-554.
40. Franceschi D, Gerding RL, Phillips G, Fratianne RB: **Risk factors associated with intravascular catheter infections in burned patients: a prospective, randomized study.** *The Journal of trauma* 1989, **29**(6):811-816.
41. Ramos G, Bolgiani A, Patino O, Prezzavento G, Guastavino P, Durlach R, Fernandez Caniggia L, Benaim F: **Antiseptic-impregnated central venous catheters: their evaluation in burn patients.** *Annals of burns and fire disasters* 2006, **19**(2):63-67.
42. Lesseva M: **Central venous catheter-related bacteraemia in burn patients.** *Scandinavian journal of infectious diseases* 1998, **30**(6):585-589.
43. Fakhry SM, Alexander J, Smith D, Meyer AA, Peterson HD: **Regional and institutional variation in burn care.** *The Journal of burn care & rehabilitation* 1995, **16**(1):86-90; discussion 85.
44. Atiyeh BS, Dibo SA, Ibrahim AE, Zgheib ER: **Acute burn resuscitation and fluid creep: it is time for colloid rehabilitation.** *Annals of burns and fire disasters* 2012, **25**(2):59-65.
45. Norman AT, Judkins KC: **Pain in the patient with burns.** *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* 2004, **4**(2):57-61.
46. MG J, LP K, F S, SE W: **Handbook of Burns Volume 1 Acute Burn Care**, vol. 1. Springer-Verlag; 2012.
47. Huang PP, Stucky FS, Dimick AR, Treat RC, Bessey PQ, Rue LW: **Hypertonic sodium resuscitation is associated with renal failure and death.** *Annals of surgery* 1995, **221**(5):543-554; discussion 554-547.
48. Fodor L, Fodor A, Ramon Y, Shoshani O, Rissin Y, Ullmann Y: **Controversies in fluid resuscitation for burn management: literature review and our experience.** *Injury* 2006, **37**(5):374-379.
49. Holm C: **Resuscitation in shock associated with burns. Tradition or evidence-based medicine?** *Resuscitation* 2000, **44**(3):157-164.
50. Tricklebank S: **Modern trends in fluid therapy for burns.** *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 2009, **35**(6):757-767.
51. Cochrane Injuries Group Albumin R: **Human albumin administration in critically ill patients: systematic review of randomised controlled trials.** *Bmj* 1998, **317**(7153):235-240.
52. Goodwin CW, Dorethy J, Lam V, Pruitt BA, Jr.: **Randomized trial of efficacy of crystalloid and colloid resuscitation on hemodynamic response and lung water following thermal injury.** *Annals of surgery* 1983, **197**(5):520-531.
53. Roberts I, Alderson P, Bunn F, Chinnock P, Ker K, Schierhout G: **Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients.** *The Cochrane database of systematic reviews* 2004(4):CD000567.
54. Bracco D, Eggimann P: **Prophylaxis with systemic antibiotics in patients with severe burns.** *Bmj* 2010, **340**:c208.
55. Holtman JR, Jr., Jellish WS: **Opioid-induced hyperalgesia and burn pain.** *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association* 2012, **33**(6):692-701.

56. Mochizuki H, Trocki O, Dominioni L, Brackett KA, Joffe SN, Alexander JW: **Mechanism of prevention of postburn hypermetabolism and catabolism by early enteral feeding.** *Annals of surgery* 1984, **200**(3):297-310.
57. Dominioni L, Trocki O, Fang CH, Mochizuki H, Ray MB, Ogle CK, Alexander JW: **Enteral feeding in burn hypermetabolism: nutritional and metabolic effects of different levels of calorie and protein intake.** *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition* 1985, **9**(3):269-279.
58. Branski LK, Al-Mousawi A, Rivero H, Jeschke MG, Sanford AP, Herndon DN: **Emerging infections in burns.** *Surgical infections* 2009, **10**(5):389-397.
59. Quinby WC, Jr., Burke JF, Bondoc CC: **Primary excision and immediate wound closure.** *Intensive care medicine* 1981, **7**(2):71-76.
60. . In: *Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented.* edn. Edited by Holzheimer RG, Mannick JA. Munich; 2001.
61. Elmasry M, Steinvall I, Thorfinn J, Abdelrahman I, Olofsson P, Sjoberg F: **Staged excisions of moderate-sized burns compared with total excision with immediate autograft: an evaluation of two strategies.** *International journal of burns and trauma* 2017, **7**(1):6-11.
62. Sheridan RL, Tompkins RG, Burke JF: **Management of burn wounds with prompt excision and immediate closure.** *Journal of intensive care medicine* 1994, **9**(1):6-17.
63. Atiyeh BS, Gunn SW, Hayek SN: **State of the art in burn treatment.** *World journal of surgery* 2005, **29**(2):131-148.
64. Barret JP, Dziewulski P, Ramzy PI, Wolf SE, Desai MH, Herndon DN: **Biobrane versus 1% silver sulfadiazine in second-degree pediatric burns.** *Plastic and reconstructive surgery* 2000, **105**(1):62-65.
65. Leshner AP, Curry RH, Evans J, Smith VA, Fitzgerald MT, Cina RA, Streck CJ, Hebra AV: **Effectiveness of Biobrane for treatment of partial-thickness burns in children.** *Journal of pediatric surgery* 2011, **46**(9):1759-1763.
66. Mogensen TH: **Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses.** *Clinical microbiology reviews* 2009, **22**(2):240-273.
67. Howland KC, Ausubel LJ, London CA, Abbas AK: **The roles of CD28 and CD40 ligand in T cell activation and tolerance.** *Journal of immunology* 2000, **164**(9):4465-4470.
68. Ziegler-Heitbrock L: **Blood Monocytes and Their Subsets: Established Features and Open Questions.** *Frontiers in immunology* 2015, **6**:423.
69. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K: **Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells.** *Science* 2010, **327**(5966):656-661.
70. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ *et al*: **Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood.** *Blood* 2010, **116**(16):e74-80.
71. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, Puel A, Biswas SK, Moshous D, Picard C *et al*: **Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors.** *Immunity* 2010, **33**(3):375-386.
72. Matsushima K, Baldwin ET, Mukaida N: **Interleukin-8 and MCAF: novel leukocyte recruitment and activating cytokines.** *Chemical immunology* 1992, **51**:236-265.
73. Chaly YV, Selvan RS, Fegeding KV, Kolesnikova TS, Voitenok NN: **Expression of IL-8 gene in human monocytes and lymphocytes: differential regulation by TNF and IL-1.** *Cytokine* 2000, **12**(6):636-643.
74. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE: **Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview.** *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 2009, **29**(6):313-326.

75. Arango Duque G, Descoteaux A: **Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases.** *Frontiers in immunology* 2014, **5**:491.
76. Dehne MG, Sablotzki A, Hoffmann A, Muhling J, Dietrich FE, Hempelmann G: **Alterations of acute phase reaction and cytokine production in patients following severe burn injury.** *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 2002, **28**(6):535-542.
77. Chimen M, Yates CM, McGettrick HM, Ward LS, Harrison MJ, Apta B, Dib LH, Imhof BA, Harrison P, Nash GB *et al*: **Monocyte Subsets Coregulate Inflammatory Responses by Integrated Signaling through TNF and IL-6 at the Endothelial Cell Interface.** *Journal of immunology* 2017, **198**(7):2834-2843.
78. Matthews VB, Allen TL, Risis S, Chan MH, Henstridge DC, Watson N, Zaffino LA, Babb JR, Boon J, Meikle PJ *et al*: **Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance.** *Diabetologia* 2010, **53**(11):2431-2441.
79. Woo MS, Yang J, Beltran C, Cho S: **Cell Surface CD36 Protein in Monocyte/Macrophage Contributes to Phagocytosis during the Resolution Phase of Ischemic Stroke in Mice.** *The Journal of biological chemistry* 2016, **291**(45):23654-23661.
80. Kneidl J, Loffler B, Erat MC, Kalinka J, Peters G, Roth J, Barczyk K: **Soluble CD163 promotes recognition, phagocytosis and killing of Staphylococcus aureus via binding of specific fibronectin peptides.** *Cellular microbiology* 2012, **14**(6):914-936.
81. Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B: **Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus.** *Scientific reports* 2015, **5**:13886.
82. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L: **The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF.** *J Immunol* 2002, **168**(7):3536-3542.
83. Lopez-Castejon G, Brough D: **Understanding the mechanism of IL-1beta secretion.** *Cytokine & growth factor reviews* 2011, **22**(4):189-195.
84. Williams L, Jarai G, Smith A, Finan P: **IL-10 expression profiling in human monocytes.** *Journal of leukocyte biology* 2002, **72**(4):800-809.
85. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I: **Immunosuppressive effects of apoptotic cells.** *Nature* 1997, **390**(6658):350-351.
86. Skrzeczynska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J: **Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10.** *Scandinavian journal of immunology* 2008, **67**(2):152-159.
87. Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HW: **Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis.** *Blood* 1996, **87**(1):373-377.
88. Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, Kourilsky P, Wong SC: **Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets.** *Blood* 2011, **118**(5):e16-31.
89. Zhao C, Tan YC, Wong WC, Sem X, Zhang H, Han H, Ong SM, Wong KL, Yeap WH, Sze SK *et al*: **The CD14(+)/low)CD16(+) monocyte subset is more susceptible to spontaneous and oxidant-induced apoptosis than the CD14(+)/CD16(-) subset.** *Cell death & disease* 2010, **1**:e95.
90. Ancuta P, Liu KY, Misra V, Wacleche VS, Gosselin A, Zhou X, Gabuzda D: **Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets.** *BMC genomics* 2009, **10**:403.

91. Boyette LB, Macedo C, Hadi K, Elinoff BD, Walters JT, Ramaswami B, Chalasani G, Taboas JM, Lakkis FG, Metes DM: **Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets.** *PLoS one* 2017, **12**(4):e0176460.
92. Lamagna C, Aurrand-Lions M, Imhof BA: **Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis.** *Journal of leukocyte biology* 2006, **80**(4):705-713.
93. Laplante P, Brillant-Marquis F, Brissette MJ, Joannette-Pilon B, Cayrol R, Kokta V, Cailhier JF: **MFG-E8 Reprogramming of Macrophages Promotes Wound Healing by Increased bFGF Production and Fibroblast Functions.** *The Journal of investigative dermatology* 2017, **137**(9):2005-2013.
94. Roszer T: **Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms.** *Mediators Inflamm* 2015, **2015**:816460.
95. Martinez FO, Gordon S: **The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment.** *F1000prime reports* 2014, **6**:13.
96. Cavaillon JM: **Cytokines and macrophages.** *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 1994, **48**(10):445-453.
97. Murray RZ, Kay JG, Sangermani DG, Stow JL: **A role for the phagosome in cytokine secretion.** *Science* 2005, **310**(5753):1492-1495.
98. Huynh KK, Kay JG, Stow JL, Grinstein S: **Fusion, fission, and secretion during phagocytosis.** *Physiology* 2007, **22**:366-372.
99. Wang KS, Frank DA, Ritz J: **Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4.** *Blood* 2000, **95**(10):3183-3190.
100. Donlon TA, Krensky AM, Wallace MR, Collins FS, Lovett M, Clayberger C: **Localization of a human T-cell-specific gene, RANTES (D17S136E), to chromosome 17q11.2-q12.** *Genomics* 1990, **6**(3):548-553.
101. Comerford I, McColl SR: **Mini-review series: focus on chemokines.** *Immunology and cell biology* 2011, **89**(2):183-184.
102. Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD: **IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking.** *Journal of immunology* 2002, **168**(7):3195-3204.
103. Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Ogborne KT, Loetscher M, Gladue RP, Lin W, Boyd JG, Moser B, Wood DE *et al*: **Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3.** *The Journal of experimental medicine* 1998, **187**(12):2009-2021.
104. Jaguin M, Houibert N, Fardel O, Lecureur V: **Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin.** *Cellular immunology* 2013, **281**(1):51-61.
105. Lu J, Cao Q, Zheng D, Sun Y, Wang C, Yu X, Wang Y, Lee VW, Zheng G, Tan TK *et al*: **Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease.** *Kidney international* 2013, **84**(4):745-755.
106. Beyer M, Mallmann MR, Xue J, Staratschek-Jox A, Vorholt D, Krebs W, Sommer D, Sander J, Mertens C, Nino-Castro A *et al*: **High-resolution transcriptome of human macrophages.** *PLoS one* 2012, **7**(9):e45466.
107. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A: **IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages.** *Journal of immunology* 1991, **147**(11):3815-3822.

108. Oswald IP, Wynn TA, Sher A, James SL: **Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, **89**(18):8676-8680.
109. Chadban SJ, Tesch GH, Foti R, Lan HY, Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ: **Interleukin-10 differentially modulates MHC class II expression by mesangial cells and macrophages in vitro and in vivo.** *Immunology* 1998, **94**(1):72-78.
110. Ogden CA, Pound JD, Batth BK, Owens S, Johannessen I, Wood K, Gregory CD: **Enhanced apoptotic cell clearance capacity and B cell survival factor production by IL-10-activated macrophages: implications for Burkitt's lymphoma.** *Journal of immunology* 2005, **174**(5):3015-3023.
111. Travis MA, Sheppard D: **TGF-beta activation and function in immunity.** *Annual review of immunology* 2014, **32**:51-82.
112. Aziz MM, Ishihara S, Rumi MA, Mishima Y, Oshima N, Kadota C, Moriyama I, Li YY, Rahman FB, Otani A *et al*: **Prolactin induces MFG-E8 production in macrophages via transcription factor C/EBPbeta-dependent pathway.** *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2008, **13**(5):609-620.
113. Yamada K, Uchiyama A, Uehara A, Perera B, Ogino S, Yokoyama Y, Takeuchi Y, Udey MC, Ishikawa O, Motegi S: **MFG-E8 Drives Melanoma Growth by Stimulating Mesenchymal Stromal Cell-Induced Angiogenesis and M2 Polarization of Tumor-Associated Macrophages.** *Cancer research* 2016, **76**(14):4283-4292.
114. Youn JI, Gabrilovich DI: **The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity.** *European journal of immunology* 2010, **40**(11):2969-2975.
115. Cuenca AG, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Moreno C, Scumpia PO, Laface DM, Heyworth PG, Efron PA, Moldawer LL: **A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma.** *Molecular medicine* 2011, **17**(3-4):281-292.
116. Rodriguez PC, Ochoa AC: **Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives.** *Immunological reviews* 2008, **222**:180-191.
117. Bronte V, Zanovello P: **Regulation of immune responses by L-arginine metabolism.** *Nature reviews Immunology* 2005, **5**(8):641-654.
118. Corzo CA, Cotter MJ, Cheng P, Cheng F, Kusmartsev S, Sotomayor E, Padhya T, McCaffrey TV, McCaffrey JC, Gabrilovich DI: **Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells.** *Journal of immunology* 2009, **182**(9):5693-5701.
119. Umansky V, Blattner C, Gebhardt C, Utikal J: **The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in Cancer Progression.** *Vaccines* 2016, **4**(4).
120. Rodriguez PC, Hernandez CP, Quiceno D, Dubinett SM, Zabaleta J, Ochoa JB, Gilbert J, Ochoa AC: **Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma.** *The Journal of experimental medicine* 2005, **202**(7):931-939.
121. Satthaporn S, Eremin O: **Dendritic cells (I): Biological functions.** *Journal of the Royal College of Surgeons of Edinburgh* 2001, **46**(1):9-19.
122. Mellman I: **Dendritic cells: master regulators of the immune response.** *Cancer immunology research* 2013, **1**(3):145-149.
123. Diebold SS: **Activation of dendritic cells by toll-like receptors and C-type lectins.** *Handbook of experimental pharmacology* 2009(188):3-30.

124. ten Broeke T, Wubbolts R, Stoorvogel W: **MHC class II antigen presentation by dendritic cells regulated through endosomal sorting.** *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2013, **5**(12):a016873.
125. Dudek AM, Martin S, Garg AD, Agostinis P: **Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity.** *Frontiers in immunology* 2013, **4**:438.
126. Wykes M, MacPherson G: **Dendritic cell-B-cell interaction: dendritic cells provide B cells with CD40-independent proliferation signals and CD40-dependent survival signals.** *Immunology* 2000, **100**(1):1-3.
127. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA: **CD28/B7 system of T cell costimulation.** *Annual review of immunology* 1996, **14**:233-258.
128. Kawabe T, Matsushima M, Hashimoto N, Imaizumi K, Hasegawa Y: **CD40/CD40 ligand interactions in immune responses and pulmonary immunity.** *Nagoya journal of medical science* 2011, **73**(3-4):69-78.
129. Kiener PA, Moran-Davis P, Rankin BM, Wahl AF, Aruffo A, Hollenbaugh D: **Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes.** *Journal of immunology* 1995, **155**(10):4917-4925.
130. Stout RD, Suttles J, Xu J, Grewal IS, Flavell RA: **Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice.** *Journal of immunology* 1996, **156**(1):8-11.
131. Tian L, Noelle RJ, Lawrence DA: **Activated T cells enhance nitric oxide production by murine splenic macrophages through gp39 and LFA-1.** *European journal of immunology* 1995, **25**(1):306-309.
132. Shu U, Kuniwa M, Wu CY, Maliszewski C, Vezzio N, Hakimi J, Gately M, Delespesse G: **Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction.** *European journal of immunology* 1995, **25**(4):1125-1128.
133. Campbell KA, Owendale PJ, Kennedy MK, Fanslow WC, Reed SG, Maliszewski CR: **CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to Leishmania major.** *Immunity* 1996, **4**(3):283-289.
134. Grewal IS, Flavell RA: **CD40 and CD154 in cell-mediated immunity.** *Annual review of immunology* 1998, **16**:111-135.
135. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G: **Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation.** *The Journal of experimental medicine* 1996, **184**(2):747-752.
136. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J: **Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking.** *The Journal of experimental medicine* 1994, **180**(4):1263-1272.
137. Grewal IS, Flavell RA: **The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation.** *Immunological reviews* 1996, **153**:85-106.
138. Ranheim EA, Kipps TJ: **Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal.** *The Journal of experimental medicine* 1993, **177**(4):925-935.
139. Romagnani S: **Th1/Th2 cells.** *Inflammatory bowel diseases* 1999, **5**(4):285-294.
140. Constant SL, Bottomly K: **Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches.** *Annual review of immunology* 1997, **15**:297-322.
141. Kidd P: **Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease.** *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* 2003, **8**(3):223-246.

142. Villarino AV, Tato CM, Stumhofer JS, Yao Z, Cui YK, Hennighausen L, O'Shea JJ, Hunter CA: **Helper T cell IL-2 production is limited by negative feedback and STAT-dependent cytokine signals.** *The Journal of experimental medicine* 2007, **204**(1):65-71.
143. Smith KA: **Interleukin-2: inception, impact, and implications.** *Science* 1988, **240**(4856):1169-1176.
144. Malek TR, Bayer AL: **Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2.** *Nature reviews Immunology* 2004, **4**(9):665-674.
145. Romagnani S: **Lymphokine production by human T cells in disease states.** *Annu Rev Immunol* 1994, **12**:227-257.
146. McKenzie GJ, Bancroft A, Grecis RK, McKenzie AN: **A distinct role for interleukin-13 in Th2-cell-mediated immune responses.** *Current biology : CB* 1998, **8**(6):339-342.
147. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA: **Th17 cells in human disease.** *Immunological reviews* 2008, **223**:87-113.
148. Plank MW, Kaiko GE, Maltby S, Weaver J, Tay HL, Shen W, Wilson MS, Durum SK, Foster PS: **Th22 Cells Form a Distinct Th Lineage from Th17 Cells In Vitro with Unique Transcriptional Properties and Tbet-Dependent Th1 Plasticity.** *Journal of immunology* 2017, **198**(5):2182-2190.
149. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, Odorisio T, Traidl-Hoffmann C, Behrendt H *et al*: **Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling.** *The Journal of clinical investigation* 2009, **119**(12):3573-3585.
150. Kaplan MH: **Th9 cells: differentiation and disease.** *Immunological reviews* 2013, **252**(1):104-115.
151. Tan C, Gery I: **The unique features of Th9 cells and their products.** *Critical reviews in immunology* 2012, **32**(1):1-10.
152. Belkaid Y: **Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity.** *Nature reviews Immunology* 2007, **7**(11):875-888.
153. Wang Y, Ma Y, Fang Y, Wu S, Liu L, Fu D, Shen X: **Regulatory T cell: a protection for tumour cells.** *Journal of cellular and molecular medicine* 2012, **16**(3):425-436.
154. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T: **Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?** *International immunology* 2009, **21**(10):1105-1111.
155. Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG: **The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells.** *International archives of allergy and immunology* 2002, **129**(4):263-276.
156. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA: **The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function.** *Nature* 2007, **450**(7169):566-569.
157. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ: **Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism.** *Journal of immunology* 2005, **174**(4):1783-1786.
158. Andersen MH, Schrama D, Straten P, JC B: **Cytotoxic T Cells.** *Journal of Investigative Dermatology* 2006, **126**(1):32-41.
159. Gulzar N, Copeland KF: **CD8+ T-cells: function and response to HIV infection.** *Current HIV research* 2004, **2**(1):23-37.
160. Chung JB, Silverman M, Monroe JG: **Transitional B cells: step by step towards immune competence.** *Trends in immunology* 2003, **24**(6):343-349.

161. Lou Z, Casali P, Xu Z: **Regulation of B Cell Differentiation by Intracellular Membrane-Associated Proteins and microRNAs: Role in the Antibody Response.** *Frontiers in immunology* 2015, **6**:537.
162. Shlomchik MJ, Weisel F: **Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells.** *Immunological reviews* 2012, **247**(1):52-63.
163. Yuseff MI, Pierobon P, Reversat A, Lennon-Dumenil AM: **How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity.** *Nature reviews Immunology* 2013, **13**(7):475-486.
164. Xu Z, Zan H, Pone EJ, Mai T, Casali P: **Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond.** *Nature reviews Immunology* 2012, **12**(7):517-531.
165. Ubelhart R, Hug E, Bach MP, Wossning T, Duhren-von Minden M, Horn AH, Tsiantoulas D, Kometani K, Kurosaki T, Binder CJ *et al*: **Responsiveness of B cells is regulated by the hinge region of IgD.** *Nature immunology* 2015, **16**(5):534-543.
166. Crotty S: **A brief history of T cell help to B cells.** *Nature reviews Immunology* 2015, **15**(3):185-189.
167. van Kooten C, Banchereau J: **Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells.** *Current opinion in immunology* 1997, **9**(3):330-337.
168. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM: **The generation of antibody-secreting plasma cells.** *Nature reviews Immunology* 2015, **15**(3):160-171.
169. Westman G, Sohrabian A, Aurelius E, Ahlm C, Schliamsner S, Sund F, Studahl M, Ronnelid J: **Clinical significance of IgM and IgA class anti-NMDAR antibodies in herpes simplex encephalitis.** *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2018, **103**:75-80.
170. Mond JJ, Lees A, Snapper CM: **T cell-independent antigens type 2.** *Annual review of immunology* 1995, **13**:655-692.
171. Cerutti A, Chen K, Chorny A: **Immunoglobulin responses at the mucosal interface.** *Annual review of immunology* 2011, **29**:273-293.
172. Gould HJ, Sutton BJ: **IgE in allergy and asthma today.** *Nature reviews Immunology* 2008, **8**(3):205-217.
173. Armitage RJ, Alderson MR: **B-cell stimulation.** *Current opinion in immunology* 1995, **7**(2):243-247.
174. Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, Ambrose C, Lawton P, Bixler S, Acha-Orbea H *et al*: **BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth.** *The Journal of experimental medicine* 1999, **189**(11):1747-1756.
175. Mackay F, Browning JL: **BAFF: a fundamental survival factor for B cells.** *Nature reviews Immunology* 2002, **2**(7):465-475.
176. Moore PA, Belvedere O, Orr A, Pieri K, LaFleur DW, Feng P, Soppet D, Charters M, Gentz R, Parmelee D *et al*: **BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator.** *Science* 1999, **285**(5425):260-263.
177. Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, Moore PA, Olsen HS, Migone TS, Sosnovtseva S, Carrell JA, Feng P, Giri JG *et al*: **Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells.** *Blood* 2001, **97**(1):198-204.
178. Avery DT, Kalled SL, Ellyard JJ, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, Brink R, Mackay F, Hodgkin PD, Tangye SG: **BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells.** *J Clin Invest* 2003, **112**(2):286-297.
179. Lavie F, Miceli-Richard C, Ittah M, Sellam J, Gottenberg JE, Mariette X: **B-cell activating factor of the tumour necrosis factor family expression in blood monocytes and T cells**

- from patients with primary Sjogren's syndrome. *Scandinavian journal of immunology* 2008, **67**(2):185-192.
180. Batten M, Groom J, Cachero TG, Qian F, Schneider P, Tschopp J, Browning JL, Mackay F: **BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes.** *The Journal of experimental medicine* 2000, **192**(10):1453-1466.
181. Do RK, Hatada E, Lee H, Tourigny MR, Hilbert D, Chen-Kiang S: **Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response.** *The Journal of experimental medicine* 2000, **192**(7):953-964.
182. Yeh FL, Lin WL, Shen HD, Fang RH: **Changes in serum tumour necrosis factor-alpha in burned patients.** *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 1997, **23**(1):6-10.
183. de Bandt JP, Chollet-Martin S, Hervann A, Lioret N, du Roure LD, Lim SK, Vaubourdolle M, Guechot J, Saizy R, Giboudeau J *et al*: **Cytokine response to burn injury: relationship with protein metabolism.** *The Journal of trauma* 1994, **36**(5):624-628.
184. Venet F, Tissot S, Debard AL, Faudot C, Crampe C, Pachot A, Ayala A, Monneret G: **Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: Correlation with severity and secondary septic shock.** *Critical care medicine* 2007, **35**(8):1910-1917.
185. Molloy RG, O'Riordain M, Holzheimer R, Nestor M, Collins K, Mannick JA, Rodrick ML: **Mechanism of increased tumor necrosis factor production after thermal injury. Altered sensitivity to PGE2 and immunomodulation with indomethacin.** *Journal of immunology* 1993, **151**(4):2142-2149.
186. Carsin H, Assicot M, Feger F, Roy O, Pennacino I, Le Bever H, Ainaud P, Bohuon C: **Evolution and significance of circulating procalcitonin levels compared with IL-6, TNF alpha and endotoxin levels early after thermal injury.** *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 1997, **23**(3):218-224.
187. Drost AC, Burlison DG, Cioffi WG, Jr., Jordan BS, Mason AD, Jr., Pruitt BA, Jr.: **Plasma cytokines following thermal injury and their relationship with patient mortality, burn size, and time postburn.** *The Journal of trauma* 1993, **35**(3):335-339.
188. Ribeiro CA, Andrade C, Polanczyk CA, Clausell N: **Association between early detection of soluble TNF-receptors and mortality in burn patients.** *Intensive care medicine* 2002, **28**(4):472-478.
189. Vindenes HA, Ulvestad E, Bjerknes R: **Concentrations of cytokines in plasma of patients with large burns: their relation to time after injury, burn size, inflammatory variables, infection, and outcome.** *The European journal of surgery = Acta chirurgica* 1998, **164**(9):647-656.
190. Polo M, Ko F, Busillo F, Cruse CW, Krizek TJ, Robson MC: **The 1997 Moyer Award. Cytokine production in patients with hypertrophic burn scars.** *The Journal of burn care & rehabilitation* 1997, **18**(6):477-482.
191. Yeh FL, Lin WL, Shen HD, Fang RH: **Changes in circulating levels of interleukin 6 in burned patients.** *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 1999, **25**(2):131-136.
192. Nijsten MW, Hack CE, Helle M, ten Duis HJ, Klasen HJ, Aarden LA: **Interleukin-6 and its relation to the humoral immune response and clinical parameters in burned patients.** *Surgery* 1991, **109**(6):761-767.
193. Struzyna J, Pojda Z, Braun B, Chomiccka M, Sobiczewska E, Wrembel J: **Serum cytokine levels (IL-4, IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF) in burned patients.** *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 1995, **21**(6):437-440.

194. Yeh FL, Lin WL, Shen HD, Fang RH: **Changes in levels of serum IL-8 in burned patients.** *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 1997, **23**(7-8):555-559.
195. Bjornson AB, Bjornson HS, Altemeier WA: **Serum-mediated inhibition of polymorphonuclear leukocyte function following burn injury.** *Annals of surgery* 1981, **194**(5):568-575.
196. Alexander JW, Wixson D: **Neutrophil dysfunction and sepsis in burn injury.** *Surgery, gynecology & obstetrics* 1970, **130**(3):431-438.
197. Solomkin JS: **Neutrophil disorders in burn injury: complement, cytokines, and organ injury.** *The Journal of trauma* 1990, **30**(12 Suppl):S80-85.
198. Garner WL, Rodriguez JL, Miller CG, Till GO, Rees RS, Smith DJ, Remick DG: **Acute skin injury releases neutrophil chemoattractants.** *Surgery* 1994, **116**(1):42-48.
199. Fayazov AD, Shukurov SI, Shukurov BI, Sultanov BC, Namazov AN, Ruzimuratov DA: **Disorders of the immune system in severely burned patients.** *Annals of burns and fire disasters* 2009, **22**(3):121-130.
200. Bjercknes R, Vindenes H, Laerum OD: **Altered neutrophil functions in patients with large burns.** *Blood cells* 1990, **16**(1):127-141; discussion 142-123.
201. Schwacha MG: **Macrophages and post-burn immune dysfunction.** *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 2003, **29**(1):1-14.
202. Schwacha MG, Chaudry IH: **The cellular basis of post-burn immunosuppression: macrophages and mediators.** *International journal of molecular medicine* 2002, **10**(3):239-243.
203. Rose LF, Chan RK: **The Burn Wound Microenvironment.** *Advances in wound care* 2016, **5**(3):106-118.
204. Yeh FL, Lin WL, Shen HD: **Changes in circulating levels of an anti-inflammatory cytokine interleukin 10 in burned patients.** *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 2000, **26**(5):454-459.
205. Sherry RMM, Cue JIM, Goddard JKP, Parramore JBM, DiPiro JTP: **Interleukin-10 Is Associated with the Development of Sepsis in Trauma Patients.** *The Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 1996, **40**(4):613-617.
206. Eitas TK, Stepp WH, Sjeklocha L, Long CV, Riley C, Callahan J, Sanchez Y, Gough P, Knowlin L, van Duin D *et al*: **Differential regulation of innate immune cytokine production through pharmacological activation of Nuclear Factor-Erythroid-2-Related Factor 2 (NRF2) in burn patient immune cells and monocytes.** *PloS one* 2017, **12**(9):e0184164.
207. Infanger M, Schmidt O, Kossmehl P, Grad S, Ertel W, Grimm D: **Vascular endothelial growth factor serum level is strongly enhanced after burn injury and correlated with local and general tissue edema.** *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 2004, **30**(4):305-311.
208. Grad S, Ertel W, Keel M, Infanger M, Vonderschmitt DJ, Maly FE: **Strongly enhanced serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) after polytrauma and burn.** *Clinical chemistry and laboratory medicine* 1998, **36**(6):379-383.
209. Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM: **Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis.** *Current topics in microbiology and immunology* 1999, **237**:97-132.
210. Dong N, Yao YM, Cao YJ, He LX, Chai JK, Xu S, Sheng ZY: **[Clinical significance of changes in quantitative expression of human leukocyte antigen DR in severely burned patients].** *Zhonghua wai ke za zhi [Chinese journal of surgery]* 2007, **45**(11):766-769.

211. Winkler MS, Rissiek A, Priefler M, Schwedhelm E, Robbe L, Bauer A, Zahrte C, Zoellner C, Kluge S, Nierhaus A: **Human leucocyte antigen (HLA-DR) gene expression is reduced in sepsis and correlates with impaired TNFalpha response: A diagnostic tool for immunosuppression?** *PLoS one* 2017, **12**(8):e0182427.
212. Noronha SA, Noronha SM, Lanziani LE, Ferreira LM, Gragnani A: **Innate and adaptive immunity gene expression of human keratinocytes cultured of severe burn injury.** *Acta cirurgica brasileira* 2014, **29 Suppl 3**:60-67.
213. Altman LC, Furukawa CT, Klebanoff SJ: **Depressed mononuclear leukocyte chemotaxis in thermally injured patients.** *Journal of immunology* 1977, **119**(1):199-205.
214. Barlow Y: **T lymphocytes and immunosuppression in the burned patient: a review.** *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 1994, **20**(6):487-490.
215. Organ BC, Antonacci AC, Chiao J, Chiao J, Kumar A, de Riesthal HF, Yuan L, Black D, Calvano SE: **Changes in lymphocyte number and phenotype in seven lymphoid compartments after thermal injury.** *Ann Surg* 1989, **210**(1):78-89.
216. Burleson DG, Mason AD, Jr., Pruitt BA, Jr.: **Lymphoid subpopulation changes after thermal injury and thermal injury with infection in an experimental model.** *Annals of surgery* 1988, **207**(2):208-212.
217. Horgan AF, Mendez MV, O'Riordain DS, Holzheimer RG, Mannick JA, Rodrick ML: **Altered gene transcription after burn injury results in depressed T-lymphocyte activation.** *Annals of surgery* 1994, **220**(3):342-351; discussion 351-342.
218. Teodorczyk-Injeyan JA, Sparkes BG, Mills GB, Peters WJ, Falk RE: **Impairment of T cell activation in burn patients: a possible mechanism of thermal injury-induced immunosuppression.** *Clinical and experimental immunology* 1986, **65**(3):570-581.
219. Wood JJ, Rodrick ML, O'Mahony JB, Palder SB, Saporoschetz I, D'Eon P, Mannick JA: **Inadequate interleukin 2 production. A fundamental immunological deficiency in patients with major burns.** *Annals of surgery* 1984, **200**(3):311-320.
220. Rodrick ML, Wood JJ, Grbic JT, O'Mahony JB, Davis CF, Moss NM, Blazar BA, Demling RH, Mannick JA: **Defective IL-2 production in patients with severe burns and sepsis.** *Lymphokine research* 1986, **5 Suppl 1**:S75-80.
221. Faist E, Mewes A, Strasser T, Walz A, Alkan S, Baker C, Ertel W, Heberer G: **Alteration of monocyte function following major injury.** *Archives of surgery* 1988, **123**(3):287-292.
222. Heideman M, Bengtsson A: **The immunologic response to thermal injury.** *World journal of surgery* 1992, **16**(1):53-56.
223. Hanschen M, Tajima G, O'Leary F, Ikeda K, Lederer JA: **Injury induces early activation of T-cell receptor signaling pathways in CD4+ regulatory T cells.** *Shock* 2011, **35**(3):252-257.
224. Huang LF, Yao YM, Dong N, Yu Y, He LX, Sheng ZY: **Association between regulatory T cell activity and sepsis and outcome of severely burned patients: a prospective, observational study.** *Critical care* 2010, **14**(1):R3.
225. Jiang LN, Yao YM, Sheng ZY: **The role of regulatory T cells in the pathogenesis of sepsis and its clinical implication.** *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 2012, **32**(8):341-349.
226. Yao YM, Huang LF: **[The potential role of regulatory T cells in postburn sepsis].** *Zhonghua shao shang za zhi = Zhonghua shaoshang zazhi = Chinese journal of burns* 2011, **27**(2):81-83.
227. Hansbrough JF, Miller LM, Field TO, Jr., Gadd MA: **High dose intravenous immunoglobulin therapy in burn patients: pharmacokinetics and effects on microbial**

- opsonization and phagocytosis.** *The Pediatric infectious disease journal* 1988, **7**(5 Suppl):S49-56.
228. Arturson G, Hogman CF, Johansson SG, Killander J: **Changes in immunoglobulin levels in severely burned patients.** *Lancet* 1969, **1**(7594):546-548.
229. Sobouti B, Fallah S, Ghavami Y, Moradi M: **Serum immunoglobulin levels in pediatric burn patients.** *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 2013, **39**(3):473-476.
230. Bariar LM, Bal A, Hasan A, Sharma V: **Serum levels of immunoglobulins in thermal burns.** *Journal of the Indian Medical Association* 1996, **94**(4):133-134.
231. Sengupta SR, Sukhtankar AY, Dhole TN, Dubey KP: **Humoral immunity in burns.** *Burns, including thermal injury* 1982, **8**(3):172-175.
232. Brudecki L, Ferguson DA, McCall CE, El Gazzar M: **Myeloid-derived suppressor cells evolve during sepsis and can enhance or attenuate the systemic inflammatory response.** *Infection and immunity* 2012, **80**(6):2026-2034.
233. van der Poll T: **Myeloid-derived Suppressor Cells in Sepsis.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2017, **196**(3):256-258.
234. Ost M, Singh A, Peschel A, Mehling R, Rieber N, Hartl D: **Myeloid-Derived Suppressor Cells in Bacterial Infections.** *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2016, **6**:37.
235. Bradley LM, Haynes L, Swain SL: **IL-7: maintaining T-cell memory and achieving homeostasis.** *Trends in immunology* 2005, **26**(3):172-176.
236. Hattori M, Taylor TD: **The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology.** *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 2009, **16**(1):1-12.
237. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R: **The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view.** *Cell* 2012, **148**(6):1258-1270.
238. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D: **A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria.** *Journal of microbiological methods* 2007, **69**(2):330-339.
239. Jovel J, Patterson J, Wang W, Hotte N, O'Keefe S, Mitchel T, Perry T, Kao D, Mason AL, Madsen KL *et al*: **Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics.** *Frontiers in microbiology* 2016, **7**:459.
240. Tuddenham S, Sears CL: **The intestinal microbiome and health.** *Current opinion in infectious diseases* 2015, **28**(5):464-470.
241. Kamada N, Nunez G: **Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria.** *Gastroenterology* 2014, **146**(6):1477-1488.
242. Mu Q, Tavella VJ, Luo XM: **Role of Lactobacillus reuteri in Human Health and Diseases.** *Frontiers in microbiology* 2018, **9**:757.
243. Rabizadeh S, Sears C: **New horizons for the infectious diseases specialist: how gut microflora promote health and disease.** *Current infectious disease reports* 2008, **10**(2):92-98.
244. Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, Goodman AL, Gordon JI: **Human nutrition, the gut microbiome and the immune system.** *Nature* 2011, **474**(7351):327-336.
245. Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP *et al*: **Human gut microbiome viewed across age and geography.** *Nature* 2012, **486**(7402):222-227.
246. Schulz MD, Atay C, Heringer J, Romrig FK, Schwitalla S, Aydin B, Ziegler PK, Varga J, Reindl W, Pommerenke C *et al*: **High-fat-diet-mediated dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis independently of obesity.** *Nature* 2014, **514**(7523):508-512.

247. Muegge BD, Kuczynski J, Knights D, Clemente JC, Gonzalez A, Fontana L, Henrissat B, Knight R, Gordon JI: **Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans.** *Science* 2011, **332**(6032):970-974.
248. Odamaki T, Kato K, Sugahara H, Hashikura N, Takahashi S, Xiao JZ, Abe F, Osawa R: **Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study.** *BMC microbiology* 2016, **16**:90.
249. Viaud S, Saccheri F, Mignot G, Yamazaki T, Daillere R, Hannani D, Enot DP, Pfirschke C, Engblom C, Pittet MJ *et al*: **The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide.** *Science* 2013, **342**(6161):971-976.
250. Franchi L, Kamada N, Nakamura Y, Burberry A, Kuffa P, Suzuki S, Shaw MH, Kim YG, Nunez G: **NLR4-driven production of IL-1beta discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense.** *Nature immunology* 2012, **13**(5):449-456.
251. Honda K, Littman DR: **The microbiome in infectious disease and inflammation.** *Annual review of immunology* 2012, **30**:759-795.
252. Engen PA, Green SJ, Voigt RM, Forsyth CB, Keshavarzian A: **The Gastrointestinal Microbiome: Alcohol Effects on the Composition of Intestinal Microbiota.** *Alcohol research : current reviews* 2015, **37**(2):223-236.
253. Kamada N, Seo SU, Chen GY, Nunez G: **Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease.** *Nature reviews Immunology* 2013, **13**(5):321-335.
254. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR: **Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(34):13780-13785.
255. Khanna S, Raffals LE: **The Microbiome in Crohn's Disease: Role in Pathogenesis and Role of Microbiome Replacement Therapies.** *Gastroenterology clinics of North America* 2017, **46**(3):481-492.
256. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB: **Gut microbiota in health and disease.** *Physiological reviews* 2010, **90**(3):859-904.
257. Shimizu K, Ogura H, Goto M, Asahara T, Nomoto K, Morotomi M, Yoshiya K, Matsushima A, Sumi Y, Kuwagata Y *et al*: **Altered gut flora and environment in patients with severe SIRS.** *The Journal of trauma* 2006, **60**(1):126-133.
258. Earley ZM, Akhtar S, Green SJ, Naqib A, Khan O, Cannon AR, Hammer AM, Morris NL, Li X, Eberhardt JM *et al*: **Burn Injury Alters the Intestinal Microbiome and Increases Gut Permeability and Bacterial Translocation.** *PloS one* 2015, **10**(7):e0129996.
259. Magnotti LJ, Deitch EA: **Burns, bacterial translocation, gut barrier function, and failure.** *The Journal of burn care & rehabilitation* 2005, **26**(5):383-391.
260. Maejima K, Deitch E, Berg R: **Promotion by burn stress of the translocation of bacteria from the gastrointestinal tracts of mice.** *Archives of surgery* 1984, **119**(2):166-172.
261. LeVoyer T, Cioffi WG, Jr., Pratt L, Shippee R, McManus WF, Mason AD, Jr., Pruitt BA, Jr.: **Alterations in intestinal permeability after thermal injury.** *Archives of surgery* 1992, **127**(1):26-29; discussion 29-30.
262. Deitch EA, Berg RD: **Endotoxin but not malnutrition promotes bacterial translocation of the gut flora in burned mice.** *The Journal of trauma* 1987, **27**(2):161-166.
263. Ryan CM, Yarmush ML, Burke JF, Tompkins RG: **Increased gut permeability early after burns correlates with the extent of burn injury.** *Critical care medicine* 1992, **20**(11):1508-1512.

264. Deitch EA: **Intestinal permeability is increased in burn patients shortly after injury.** *Surgery* 1990, **107**(4):411-416.
265. Maejima K, Deitch EA, Berg RD: **Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of rats receiving thermal injury.** *Infection and immunity* 1984, **43**(1):6-10.
266. MacFie J, O'Boyle C, Mitchell CJ, Buckley PM, Johnstone D, Sudworth P: **Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity.** *Gut* 1999, **45**(2):223-228.
267. Grice EA, Segre JA: **The skin microbiome.** *Nature reviews Microbiology* 2011, **9**(4):244-253.
268. Mann ER SK, Bernardo D, Al-Hassi HO, Knight SC, et al.: **Review: Skin and the Immune System.** *J Clin Exp Dermatol Res* 2012.
269. Scharschmidt TC, Vasquez KS, Truong HA, Gearty SV, Pauli ML, Nosbaum A, Gratz IK, Otto M, Moon JJ, Liese J et al: **A Wave of Regulatory T Cells into Neonatal Skin Mediates Tolerance to Commensal Microbes.** *Immunity* 2015, **43**(5):1011-1021.
270. Sherwani MA, Tufail S, Muzaffar AF, Yusuf N: **The skin microbiome and immune system: Potential target for chemoprevention?** *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* 2018, **34**(1):25-34.
271. Yamazaki Y, Nakamura Y, Nunez G: **Role of the microbiota in skin immunity and atopic dermatitis.** *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* 2017, **66**(4):539-544.
272. Oh J, Freeman AF, Program NCS, Park M, Sokolic R, Candotti F, Holland SM, Segre JA, Kong HH: **The altered landscape of the human skin microbiome in patients with primary immunodeficiencies.** *Genome research* 2013, **23**(12):2103-2114.
273. Liu SH, Huang YC, Chen LY, Yu SC, Yu HY, Chuang SS: **The skin microbiome of wound scars and unaffected skin in patients with moderate to severe burns in the subacute phase.** *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2018.
274. Plichta JK, Gao X, Lin H, Dong Q, Toh E, Nelson DE, Gamelli RL, Grice EA, Radek KA: **Cutaneous Burn Injury Promotes Shifts in the Bacterial Microbiome in Autologous Donor Skin: Implications for Skin Grafting Outcomes.** *Shock* 2017, **48**(4):441-448.
275. Nikkari S, McLaughlin IJ, Bi W, Dodge DE, Relman DA: **Does blood of healthy subjects contain bacterial ribosomal DNA?** *Journal of clinical microbiology* 2001, **39**(5):1956-1959.
276. Paisse S, Valle C, Servant F, Courtney M, Burcelin R, Amar J, Lelouvier B: **Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing.** *Transfusion* 2016, **56**(5):1138-1147.
277. Potgieter M, Bester J, Kell DB, Pretorius E: **The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases.** *FEMS microbiology reviews* 2015, **39**(4):567-591.
278. Grif K, Fille M, Wurzner R, Weiss G, Lorenz I, Gruber G, Eschertzhuber S, Nachbaur D, Lass-Flörl C, Orth D: **Rapid detection of bloodstream pathogens by real-time PCR in patients with sepsis.** *Wiener klinische Wochenschrift* 2012, **124**(7-8):266-270.
279. Struelens MJ: **Detection of microbial DNAemia: does it matter for sepsis management?** *Intensive care medicine* 2010, **36**(2):193-195.
280. Damgaard C, Magnussen K, Enevold C, Nilsson M, Tolker-Nielsen T, Holmstrup P, Nielsen CH: **Viable bacteria associated with red blood cells and plasma in freshly drawn blood donations.** *PLoS one* 2015, **10**(3):e0120826.

281. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H: **Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases.** *Biomarker research* 2014, **2**(1):1.
282. Rey-Giraud F, Hafner M, Ries CH: **In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions.** *PloS one* 2012, **7**(8):e42656.
283. Walker LS: **Treg and CTLA-4: two intertwining pathways to immune tolerance.** *Journal of autoimmunity* 2013, **45**:49-57.
284. Lievens D, Zernecke A, Seijkens T, Soehnlein O, Beckers L, Munnix IC, Wijnands E, Goossens P, van Kruchten R, Thevissen L *et al*: **Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis.** *Blood* 2010, **116**(20):4317-4327.
285. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczek RA: **CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells.** *Nature* 1998, **391**(6667):591-594.
286. Marck RE, van der Bijl I, Korsten H, Lorinser J, de Korte D, Middelkoop E: **Activation, function and content of platelets in burn patients.** *Platelets* 2018:1-7.
287. Schonbeck U, Libby P: **The CD40/CD154 receptor/ligand dyad.** *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2001, **58**(1):4-43.
288. Gauchat JF, Henchoz S, Mazzei G, Aubry JP, Brunner T, Blasey H, Life P, Talabot D, Flores-Romo L, Thompson J *et al*: **Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils.** *Nature* 1993, **365**(6444):340-343.
289. Gauchat JF, Henchoz S, Fattah D, Mazzei G, Aubry JP, Jomotte T, Dash L, Page K, Solari R, Aldebert D *et al*: **CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils.** *European journal of immunology* 1995, **25**(3):863-865.
290. Carbone E, Ruggiero G, Terrazzano G, Palomba C, Manzo C, Fontana S, Spits H, Karre K, Zappacosta S: **A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction.** *The Journal of experimental medicine* 1997, **185**(12):2053-2060.
291. Pinchuk LM, Klaus SJ, Magaletti DM, Pinchuk GV, Norsen JP, Clark EA: **Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation.** *Journal of immunology* 1996, **157**(10):4363-4370.
292. Goldman N, Valiuskyte K, Londregan J, Swider A, Somerville J, Riggs JE: **Macrophage regulation of B cell proliferation.** *Cell Immunol* 2017, **314**:54-62.
293. Merluzzi S, Frossi B, Gri G, Parusso S, Tripodo C, Pucillo C: **Mast cells enhance proliferation of B lymphocytes and drive their differentiation toward IgA-secreting plasma cells.** *Blood* 2010, **115**(14):2810-2817.
294. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ: **Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system.** *Immunological reviews* 2009, **229**(1):152-172.
295. Gmelig-Meyling F, Waldmann TA: **Human B cell activation in vitro: augmentation and suppression by monocytes of the immunoglobulin production induced by various B cell stimulants.** *J Immunol* 1981, **126**(2):529-537.
296. Pryjma J, Flad HD, Gruber M, Ernst M: **Monocyte-T-cell interactions in the regulation of polyclonal B-cell response.** *Scand J Immunol* 1986, **24**(1):21-28.
297. Boswell HS, Sharrow SO, Singer A: **Role of accessory cells in B cell activation. I. Macrophage presentation of TNP-Ficoll: evidence for macrophage-B cell interaction.** *J Immunol* 1980, **124**(2):989-996.
298. Harvey BP, Gee RJ, Haberman AM, Shlomchik MJ, Mamula MJ: **Antigen presentation and transfer between B cells and macrophages.** *Eur J Immunol* 2007, **37**(7):1739-1751.

299. de Boer R, Peters R, Gierveld S, Schuurman T, Kooistra-Smid M, Savelkoul P: **Improved detection of microbial DNA after bead-beating before DNA isolation.** *Journal of microbiological methods* 2010, **80**(2):209-211.
300. Yuan S, Cohen DB, Ravel J, Abdo Z, Forney LJ: **Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome.** *PloS one* 2012, **7**(3):e33865.

Annexe

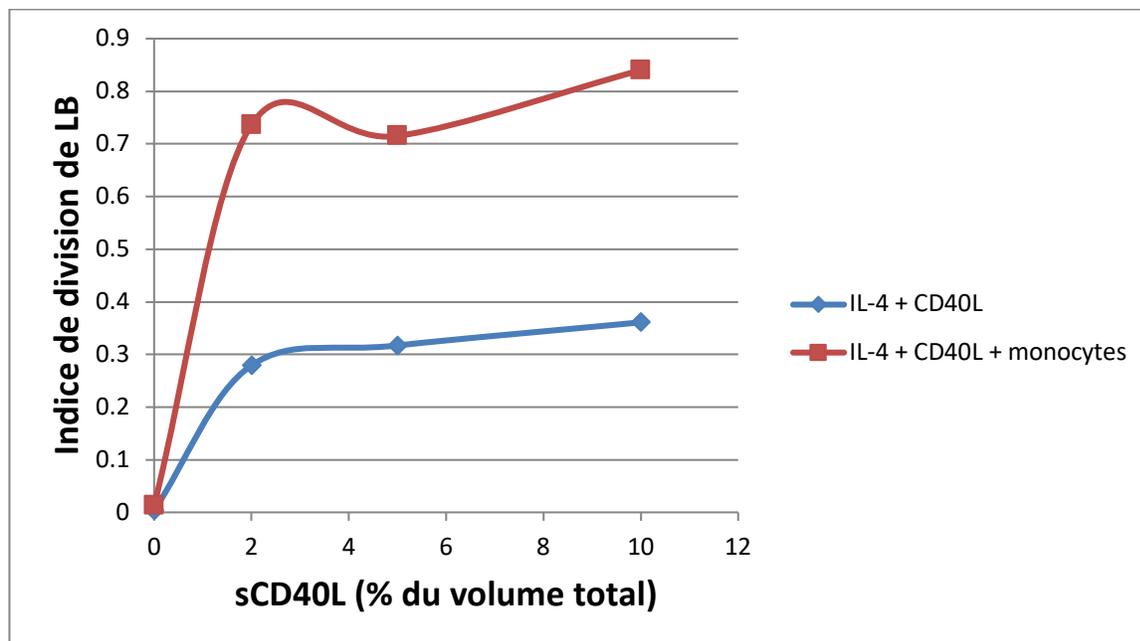


Figure S1. L'activation de la prolifération des LB par la voie CD40 est saturée avec une concentration de 10% de sCD40L. Représentation de la courbe dose-réponse de la prolifération des LB en fonction de différentes concentrations de sCD40L. Les concentrations de sCD40L testées sont 0%, 2%, 5% et 10% du volume.