

Université de Montréal

Caractérisation de l'immunosuppression à la suite d'une brûlure sévère.  
Importance et rôle des lipides de l'alimentation.

Par

Nathalie Jobin

Département de Nutrition

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de  
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
En nutrition

Avril 2001

©Nathalie Jobin, 2001



QU

145

U58

2002

v.001

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Caractérisation de l'immunosuppression à la suite d'une brûlure sévère.  
Importance et rôle des lipides de l'alimentation

Présentée par

Nathalie Jobin

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Émile Lévy

*Dr Marek Pola-Pleszczynski*

Dre Beatriz Tuchweber

Dr Jacques Bernier

Dr Dominique Garrel

Thèse acceptée le : ..... *26 mars 2002* .....

## SOMMAIRE

Les brûlures sévères constituent un traumatisme grave pour l'organisme. L'état d'immunosuppression qui succède à une réponse inflammatoire systémique, est responsable du haut taux de morbidité infectieuse et de mortalité chez ces patients. Des évidences suggèrent que l'intensité de la réponse inflammatoire systémique joue un rôle important dans la sévérité de l'immunosuppression subséquente. Toutefois les mécanismes sous-jacents à ce phénomène sont mal compris. Le support nutritionnel est maintenant reconnu comme une composante déterminante de l'évolution clinique des patients brûlés. Les lipides de la diète, en raison de leurs propriétés structurales et chimiques, possèdent des activités immunomodulatrices importantes. Le but des études présentées dans ce travail était : 1. Caractériser l'immunosuppression sous-jacente à une brûlure sévère en relation avec la réponse inflammatoire et 2. Déterminer les effets modulateurs des lipides de l'alimentation sur les fonctions immunitaires et oxydatives suite à une brûlure sévère. L'amélioration des fonctions immunitaires secondaire à une diminution de l'intensité de la réponse inflammatoire post-brûlure constituait notre principale hypothèse de travail.

Dans un premier temps, une étude faite chez les patients brûlés a permis de caractériser la présence du récepteur soluble de l'IL-2 et d'associer cette molécule à la réponse inflammatoire. L'utilisation de l'IL-2Rs recombinant a permis de montrer que cette molécule n'inhibe pas directement l'activité des lymphocytes T et, qu'elle n'est pas non plus associée à leur activation. Par contre, de fortes concentrations d'IL-2Rs pourraient, via leur capacité de liaison avec l'IL-2 circulant, participer à l'immunosuppression sous-jacente à une brûlure. Parallèlement à l'amélioration clinique des patients, l'administration d'une diète faible en lipides a permis de diminuer significativement les concentrations plasmatiques de deux marqueurs importants de l'inflammation, l'IL-6 et l'IL-2Rs. Ainsi, ces résultats suggèrent qu'une diminution de l'intensité de la réponse inflammatoire post-brûlure soit bénéfique pour le système immunitaire. Ainsi, dans notre deuxième étude nous avons voulu, à l'aide d'un modèle animal de brûlure, évaluer l'effet spécifique de la réponse inflammatoire induite par la LPS sur les fonctions du système immunitaire. L'utilisation d'une souche

résistante à la réponse inflammatoire due aux LPS a permis de montrer que l'absence d'une telle réponse inflammatoire engendre un état d'immunosuppression (démontré par la prolifération *in vitro* des splénocytes stimulés) et d'oxydation (démontré par des mesures de thiols totaux, de potentiel mitochondrial, et des dosages de malonaldehyde hépatique) prononcé et soutenu. A l'opposé, une réponse inflammatoire normale à la LPS est bénéfique et semble être nécessaire pour le rétablissement des fonctions immunitaires après une brûlure. En contournant la réponse inflammatoire due à la LPS, les souris résistantes montrent une élévation significative de l'activation des cellules accessoires qui est reflétée par l'augmentation du stress oxydatif. Cette hyperactivation pourrait être impliquée dans l'anergie profonde et persistante des lymphocytes T présente chez ces animaux. Ainsi, le stress oxydatif pourrait être impliqué dans l'induction de l'immunosuppression sous-jacente à une brûlure sévère. À cet effet, l'augmentation du stress oxydatif serait un mécanisme important par lequel les lipides de l'alimentation inhibent le système immunitaire. La troisième étude a montré, chez les souris brûlées, une exacerbation de l'inhibition de la prolifération des splénocytes et du stress oxydatif (démontré par les concentrations de MDA, thiols totaux et production *in vitro* d'oxyde nitrique) avec une élévation des lipides de la diète (45% des calories totales). À l'opposé l'administration d'une diète faible en lipides prévient complètement l'inhibition des fonctions immunitaires et l'induction du stress oxydatif. Ainsi, la modulation de la réponse inflammatoire en période post-brûlure par les lipides de la diète constitue l'originalité de ces travaux. Aucune étude n'avait étudié le rôle des lipides de l'alimentation sur les fonctions immunitaires après une brûlure. L'amélioration du traitement des patients brûlés engendrée par une modification des apports nutritionnels constitue une approche innovatrice et non-invasive pour les patients. La poursuite des travaux dans ce domaine reliant la nutrition et les fonctions du système immunitaire représente un axe de recherche déterminant pour le traitement des patients traumatisés et important pour l'avancement de la science.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>I.</b>	<b>INTRODUCTION</b>	1
<b>II.</b>	<b>CONTEXTE THÉORIQUE</b>	4
<b>1.</b>	<b>BRÛLURE</b>	5
<b>1.1.</b>	<b>RÉPONSE MÉTABOLIQUE</b>	5
<i>1.1.1.</i>	<i>Dépense énergétique</i>	7
<i>1.1.2.</i>	<i>Réponse hormonale</i>	8
<i>1.1.3.</i>	<i>Métabolisme des glucides</i>	10
<i>1.1.4.</i>	<i>Métabolisme des lipides</i>	11
<i>1.1.5.</i>	<i>Métabolisme des protéines</i>	13
<b>1.2.</b>	<b>RÉPONSE DU SYSTÈME IMMUNITAIRE</b>	15
<i>1.2.1.</i>	<i>Inflammation</i>	16
1.2.1.1.	Définition	16
1.2.1.2.	Étapes	17
1.2.1.3.	Réponse inflammatoire systémique due à la brûlure	19
1.2.1.4.	Cascade des cytokines inflammatoires	20
1.2.1.5.	Médiateurs secondaires	27
<i>1.2.2.</i>	<i>Immunosuppression</i>	33
1.2.2.1.	Lymphocytes T	34
1.2.2.2.	Lymphocytes B	41
1.2.2.3.	Macrophages	42
<i>1.2.3.</i>	<i>Facteurs nutritionnels affectant le système immunitaire</i>	43
1.2.3.1.	Support nutritionnel	44
1.2.3.2.	Protéines	45
1.2.3.3.	Lipides	46
1.2.3.4.	Glutamine	46

<b>2. LIPIDES, ÉICOSANOÏDES ET SYSTÈME IMMUNITAIRE</b>	<b>50</b>
2.1. BIOSYNTHÈSE DES ACIDES GRAS	51
2.2. SYNTHÈSE DES ÉICOSANOÏDES	55
2.3. Effets <i>in-vitro</i> DES ACIDES GRAS SUR LES FONCTIONS DES LYMPHOCYTES	58
2.4. EFFETS <i>EX-VIVO</i> DES LIPIDES DE L'ALIMENTATION SUR LES FONCTIONS DES LYMPHOCYTES	60
2.4.1. <i>Études animales</i>	60
2.4.2. <i>Études chez l'humain</i>	65
2.5. EFFETS <i>EX-VIVO</i> DES LIPIDES DE L'ALIMENTATION SUR LES FONCTIONS DES AUTRES CELLULES IMMUNITAIRES	66
2.6. MÉCANISMES SOUS-JACENTS AUX EFFETS MODULATEURS DES LIPIDES	67
2.6.1. <i>Rôles des éicosanoïdes</i>	67
2.6.2. <i>Production de cytokines</i>	69
2.6.3. <i>Stress oxydatif</i>	71
<b>3. LIPIDES DE LA DIÈTE ET BRÛLURE</b>	<b>75</b>
3.1. ÉTUDES CHEZ L'ANIMAL	75
3.2. ÉTUDES CHEZ L'HUMAIN	77
<b>4. JUSTIFICATIONS DE L'ÉTUDE</b>	<b>79</b>
<b>5. HYPOTHÈSES DE TRAVAIL</b>	<b>80</b>
<b>6. BUTS DES ÉTUDES</b>	<b>81</b>
<b>7. BIOASSAY UTILISÉS DANS CE TRAVAIL</b>	<b>82</b>
<b>III. ARTICLE 1.</b>	<b>87</b>
1. ARTICLE	88
2. CONCLUSIONS	130
3. JUSTIFICATIONS DU DEUXIÈME ARTICLE	132

<b>IV. ARTICLE 2 :</b>	134
1. ARTICLE	135
2. CONCLUSIONS	166
3. JUSTIFICATIONS DU TROISIÈME ARTICLE	168
<b>V. ARTICLE 3</b>	170
1. ARTICLE	170
2. CONCLUSIONS	211
<b>VI. DISCUSSION</b>	213
1. INTERLEUKINE-2 RÉCEPTEUR SOLUBLE : EFFETS SUR LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE ET IMMUNITAIRE APRÈS UNE BRÛLURE	214
2. EFFETS DE LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE SUR LES RÉPONSES IMMUNITAIRES ET OXYDATIVES APRÈS UNE BRÛLURE	220
3. EFFETS DES LIPIDES DE L'ALIMENTATION SUR L'IMMUNOSUPPRESSION ET LE STRESS OXYDATIF ASSOCIÉS À UNE BRÛLURE	226
4. INTERPRÉTATION GLOBALE ET CRITIQUE DES RÉSULTATS	233
5. HYPOTHÈSES	236
<b>VII. CONCLUSIONS</b>	239
<b>VIII. BIBLIOGRAPHIES</b>	241
<b>IX. ANNEXES</b>	285
1. DECREASED CORTICOSTEROID-BINDING GLOBULIN IN BURN PATIENTS : RELATIONSHIP WITH INTERLEUKIN-6 AND FAT IN NUTRITIONNAL SUPPORT	
2. DECREASED SERUM INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I IN BURN PATIENTS : RELATIONSHIP WITH SERUM INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN-3 PROTEOLYSIS AND THE INFLUENCE OF LIPID COMPOSITION IN NUTRITIONAL SUPPORT	



## LISTE DES TABLEAUX

### ARTICLE 1

TABLE 1 : Burn patient's characteristics	122
--	-----

### ARTICLE 2

TABLE 1 : Cumulative solid chow intake during 5 days of the experiment	158
TABLE 2 : Mean change in weight on days 1, 4, 7, 10 and 14 of the experiment	159
TABLE 3 : Spleen analysis of CD4 <sup>+</sup> and CD8 <sup>+</sup> populations after burn injury	160

### ARTICLE 3

TABLE 1 : Chow composition	201
TABLE 2 : Cumulative chow intake during 10 days post-injury	202
TABLE 3 : Mean change in weight	203
TABLE 4 : NO and PGE2 production by spleen cells	204
TABLE 5 : Spleen analysis of CD4 <sup>+</sup> and CD8 <sup>+</sup> cells after burn injury	205

## LISTE DES FIGURES

### CONTEXTE THÉORIQUE

FIGURE 1 : Métabolisme des acides gras polyinsaturés	76
--	----

### ARTICLE 1

FIGURE 1 : Truncated form of IL-2Rs	123
-------------------------------------	-----

FIGURE 2 : Prolifération de murine but not human IL-2 dependant T cells lines were inhibited by sera containing the soluble form of IL-2R $\alpha$	124
---	-----

FIGURE 3 : Expression of MHC class II molecule	125
--	-----

FIGURE 4 : Low fat administration was associated with lower amount of IL-6 and sIL-2R in burn patients	126
---	-----

FIGURE 5 : sIL-2R $\alpha$ inhibits the IL-2 increase in reactive NK cells	127
--	-----

FIGURE 6 : T cells mitogenic response is not affected by the presence of sIL-2R $\sigma$	128
--	-----

FIGURE 7 : Soluble IL-2R cause a defective interferon-gamma production in CD4 <sup>+</sup> T lymphocytes	129
---	-----

### ARTICLE 2

FIGURE 1 : Burn injury causes a more severe decrease of Con-A-stimulated splenocytes in endotoxine-resistant mice	161
--	-----

FIGURE 2 : Endotoxin resistant-mice present stronger and persistent inhibition of proliferation in response to anti-TcR antibody	162
---	-----

FIGURE 3 : Endotoxin-resistant mice show a higher concentration of liver malonaldehyde 10 days post-burn injury	163
--	-----

FIGURE 4 : Increased mitochondrial activity is time-related in burn endotoxin resistant mice	164
---	-----

FIGURE 5 : Endotoxin-resistant mice show higher spleen thiol concentrations	165
---	-----

**ARTICLE 3**

---

FIGURE 1 : Administration of a LF diet prevented the decrease of mitogen stimulated splenocytes after thermal injury	206
FIGURE 2 : Administration of a low fat diet had a beneficial effect on splenocyte proliferation 4 days after thermal injury	207
FIGURE 3 : LF diet-fed animals showed a decrease in concentration of liver malonaldehyde 10 days post-burn injury	208
FIGURE 4 : Administration of a HF diet induced higher spleen thiol concentrations in burned animals	209
FIGURE 5 : Increased mitochondrial activity in burned-animals fed a 25% fat diet	210

---

## LISTES DES ABRÉVIATIONS

3-MH	:	3-methylhistidine
AA	:	Acide Arachidonique
AC	:	Apport Calorique
ACTH	:	Adreno-Cortico-TrophicHormone
AGE	:	Acides Gras Essentiels
AGMI	:	Acides Gras MonoInsaturés
AGPI	:	Acides Gras PolyInsaturés
AGS	:	Acides Gras Saturés
AMPc	:	Adénosine MonoPhosphate cyclique
CBG	:	Cortisol-Binding-Globulin
Con-A	:	Concanavaline-A
COX	:	Cyclo-Oxygénase
CRF	:	Corticotropin-Releasing-Factor
GM-CSF	:	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GMPc	:	Guanosine MonoPhosphate cyclique
GPI	:	Gras PolyInsaturés
GS	:	Gras Saturés
IGF-1	:	Insulin-like Growth Factor
IL-10	:	Interleukine-10
IL-12	:	Interleukine-12
IL-13	:	Interleukine-13
IL-1Ra	:	Récepteur antagoniste de l'Interleukine-1
IL-1 $\beta$	:	Interleukine-1 beta
IL-2	:	Interleukine-2
IL-2R $\alpha$	:	Récepteur soluble alpha de l'Interleukine-2
IL-2R $\alpha$	:	Récepteur alpha de l'Interleukine-2
IL-4	:	Interleukine-4
IL-5	:	Interleukine-5

IL-6	:	Interleukine-6
IL-8	:	Interleukine-8
IL-9	:	Interleukine-9
INF $\gamma$	:	Interféron gamma
Kcal	:	Kilo-calories
Kg	:	Kilogramme
LO	:	Lipoxygénase
LPS	:	Lipopolysaccharide
LT	:	Leukotriènes
MDA	:	Malonaldehyde
MR	:	Métabolisme de Repos
NK	:	Cellules Tueuses Naturelles
NO	:	Oxide Nitrique
PAF	:	Facteur d'Activation Plaquettaire
PG	:	Prostaglandines
PGE2	:	Prostaglandines E2
PGI2	:	Prostacyclines
PKc	:	Protéines Kinases C
PLA2	:	Phospholipase A2
PLC	:	Phospholipase C
SB	:	Surface Brûlée
T°C	:	Température corporelle en Celsius
TH1 et 2	:	Sous-populations de cellules T CD4+
TNF-Rs	:	Récepteur soluble du Facteur de Nécrose Tumorale
TNF $\alpha$	:	Facteur de Nécrose Tumorale alpha
TX	:	Thromboxanes

## REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier sincèrement mes directeurs, les docteurs Dominique Garrel et Jacques Bernier, pour m'avoir fait profiter de leurs connaissances respectives. D'une façon particulière, je remercie D<sup>R</sup> Garrel pour la grande confiance qu'il m'a portée tout au long du doctorat et pour son appui. Le D<sup>F</sup> Garrel reste pour moi un modèle d'intégrité et de rigueur intellectuelle. Pour ce qui est du D<sup>F</sup> Bernier, je lui suis particulièrement reconnaissante de m'avoir guider et assister dans mes premiers pas en recherche fondamentale. Je le remercie également pour ses précieux conseils.

La générosité et l'implication de l'équipe du service de l'animalerie de l'Hôtel-Dieu de Montréal furent extrêmement appréciées. La participation de chacun des membres de ce service aura permis de faciliter la réalisation de ce projet.

Mes derniers remerciements, et non les moindres, s'adressent particulièrement à Ana De Oliveira pour son précieux travail mais aussi pour son implication personnelle qui m'a permis de réaliser ce travail dans une atmosphère agréable. Je remercie également Claudine Hamelin pour sa collaboration et sa disponibilité.

## DÉDICACE

À ma mère.

À ma famille et à mes amis qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de la rédaction de cette thèse.

À Patrice, pour son amour et sa présence.

À mon grand-père, Gérard Bolduc, pour la fierté et la reconnaissance.

## **I. INTRODUCTION**



Au cours des deux derniers siècles, la science de la nutrition a évolué de façon considérable. Les sciences de la biochimie, de la physiologie, de la chimie et de la médecine se sont unies pour établir les besoins nutritionnels nécessaires au développement normal de l'organisme humain. Toutefois, la reconnaissance de l'augmentation des besoins nutritionnels attribuables au stress et à la stimulation de la réponse immunitaire était, jusqu'à tout récemment, négligée. La recherche des vingt dernières années a permis une explosion dans les connaissances des molécules spécifique au système immunitaire.

La littérature montre, sans équivoque, qu'un déséquilibre dans la plupart des nutriments compromet la qualité, la vitesse et l'intégrité de la réponse du système immunitaire créant ainsi une susceptibilité accrue pour le développement des infections. Les lésions créées par des brûlures sévères engendrent des perturbations métaboliques profondes qui augmentent singulièrement le risque d'infections, entravent la cicatrisation et altèrent les fonctions cellulaires. Le support nutritionnel est maintenant reconnu comme une composante déterminante de l'évolution clinique des patients brûlés. Des apports nutritionnels inadéquats entravent la cicatrisation et favorisent les épisodes infectieux chez ces patients. Les lipides de l'alimentation jouent un rôle dans l'immunité notamment via des altérations structurales et la production de médiateurs chimiques. Le type et la quantité de lipides de la diète ont montré des effets modulateurs sur plusieurs paramètres du système immunitaire. En fait, des évidences suggèrent que les lipides ne soient pas une source efficace de calories après une brûlure sévère et que certaines composantes de la molécule lipidique interfèrent avec l'activité de plusieurs fonctions du système immunitaire. Chez les animaux, l'administration d'une diète faible en lipides améliore la cicatrisation et possède des effets d'épargne sur la masse musculaire. Une diminution de la durée de soins des patients, une réduction de la fréquence des infections de même qu'une diminution des concentrations d'interleukine-6 (IL-6) et du récepteur soluble à l'interleukine-2 (IL-2R $\alpha$ ) ont été observées avec l'administration d'une diète faible en lipides chez des patients sévèrement brûlés. Toutefois, aucune étude à ce jour n'avait étudié les effets de la quantité de lipides sur les paramètres immunitaires et oxydatifs suite à une brûlure. Dans ce travail nous avons étudié les effets de la quantité totale de lipides sur la réponse inflammatoire, immunitaire et

oxydative après une brûlure. Nous avons également étudié le rôle de la réponse inflammatoire sur la fonction du système immunitaire. Pour vérifier ces effets, un modèle animal de brûlure a été mis au point.



# 1. BRÛLURE

## 1.1 RÉPONSE MÉTABOLIQUE

Les lésions provoquées par les brûlures créent des perturbations métaboliques profondes en rapport avec une réponse exagérée au stress (1-3). Une brûlure sévère, qui atteint plus de 20% de la surface corporelle totale, représente la situation où la dépense énergétique et les pertes azotées sont les plus élevées. Une grande partie de la morbidité et de la mortalité causée par des brûlures sévères est secondaire à ces perturbations. qui augmentent singulièrement les risques d'infection, entravent la cicatrisation et altèrent les fonctions cellulaires. Dans cette section, nous traiterons principalement de la dépense énergétique, de la réponse hormonale et du métabolisme des glucides, lipides et protéines qui surviennent après une brûlure sévère.

La réponse métabolique à l'agression chez le brûlé est biphasique. La phase initiale est descendante, suivie d'une phase ascendante caractérisée par un hyper catabolisme. Cet état hyper catabolique implique une augmentation du métabolisme et une rupture de l'homéostasie métabolique normale (1,2). De façon plus spécifique, les perturbations métaboliques comprennent : un hyper catabolisme, une hyper pyrexie, une immunosuppression, une augmentation de la production de glucose, une mobilisation des acides aminés et une rétention liquidienne importante (2,3). Cette réponse physiologique au stress engendre également une perturbation du système endocrinien. Entre autres, nous retrouvons une augmentation des concentrations de catécholamines, du glucagon, des glucocorticoïdes, de l'aldostérone, de l'hormone anti-diurétique, de la rénine et de l'angiotensine (2). Par opposition l'insuline, l'hormone de croissance, "l'insulin-like growth factor" (IGF-1) et les hormones stéroïdiennes anaboliques et sexuelles sont à la baisse ou demeurent dans les limites des valeurs normales. De même, il a été démontré que les perturbations métaboliques subséquentes aux lésions thermiques et aux états septiques sont dues, du moins en partie, aux cytokines inflammatoires (4).

La phase initiale de la réponse à la brûlure est caractérisée par la phase de réanimation. Cette dernière persiste seulement durant quelques jours et est caractérisée par une diminution du volume intravasculaire et une perfusion tissulaire pauvre. La présence d'un faible débit cardiaque, accompagné d'un état hypo métabolique à l'intérieur duquel la demande totale en oxygène est nettement en dessous des taux normaux, définit également la phase initiale suite à une brûlure sévère (5). L'histamine, la sérotonine, les quinines, les métabolites de l'acide arachidonique, de même que les protéines du système du complément figurent parmi les médiateurs de cette réponse (1,2,6). L'administration massive de fluides dans les 24 à 48 heures post-brûlure est donc cruciale pour la survie du patient brûlé afin d'éviter la survenue d'un choc hypo volémique (6).

Suite à la réussite de la phase de réanimation liquidienne, survient rapidement une augmentation du métabolisme chez le brûlé. Cette deuxième phase, la phase de récupération, correspond aux premières semaines post-brûlure. Elle se définit par une augmentation de la réponse métabolique qui entraîne des modifications du métabolisme énergétique et protéique dont l'ultime but est de préserver les fonctions des organes vitaux et d'initier la réparation tissulaire (1,2). Plus spécifiquement, cette deuxième phase post-traumatique est caractérisée par une augmentation du métabolisme, un important catabolisme protéique, un bilan azoté négatif, une lipolyse, une rétention liquidienne, une résistance à l'insuline, une hyperglycémie et enfin une hyperthermie (7). L'augmentation de la consommation en oxygène et du métabolisme est en partie provoquée par la perte de chaleur par radiation ou évaporation au niveau des plaies (8,9), mais aussi par un effet central lié à l'inflammation agissant directement sur l'hypothalamus (10). La dégradation protéique s'explique par l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires et l'élévation de l'activité oxydative subséquente à une brûlure (4,11,12). L'augmentation des hormones cataboliques endogènes (cortisol, catécholamines, glucagon), jointe à la diminution de l'activité des agents anabolisants endogènes (hormone de croissance et testostérone), participent également à cette imposante perte protéique (13,14).

### 1.1.1 Dépense énergétique

La dépense énergétique, reflétée par la consommation d'oxygène, s'élève de façon linéaire selon l'étendue des brûlures. Elle peut atteindre des valeurs jusqu'à 100% au-dessus de la dépense énergétique de base en présence de brûlures affectant plus de 60% de la surface corporelle (15,16). Chez des patients ayant subi un traumatisme sévère, la dépense énergétique augmente vers le quatrième jour, atteint des valeurs maximales au 9<sup>e</sup> – 12<sup>e</sup> jour et demeure significativement élevée jusqu'au 23<sup>e</sup> jour post-trauma (17). De nombreuses formules ont été proposées pour estimer les besoins énergétiques du patient brûlé.

Curreri (1974)<sup>19</sup> :  $(25 \text{ kcal.kg}^{-1}) = (40 \text{ kcal} \times \text{Surface Brûlée } \%)$

Wolfe (1981)<sup>20</sup> :  $\text{MR} \times 2$

MR :métabolisme de repos selon formule Harris-Benedict)

Allard (1990)<sup>18</sup> :  $-4.343 + (0.84 \times \text{MR}) + (0.23 \times \text{AC}) = (10.5 \times \text{SB}) + (114 \times \text{T}^\circ) - (4.5 \text{ J})$

MR : métabolisme de repos

AC : apport calorique

SB : surface brûlée (%)

T° : température corporelle en Celsius

J : nombre de jours écoulés depuis la brûlure

La divergence observée entre les formules utilisées exprime les différences inter-individuelles, de même que l'environnement et les techniques des soins des plaies qui varient selon les institutions. La formule de Curreri demeure toutefois la plus utilisée dans les centres de brûlés. Pour des brûlures de plus de 40% de la surface corporelle, il n'existe aucune relation entre la taille de la brûlure et la dépense énergétique de base (19). Conséquemment les formules qui incluent la taille de la brûlure dans leurs équations ont tendance à surestimer les besoins énergétiques des patients présentant des brûlures étendues. Notons que ces derniers sont justement ceux qui possèdent le moins de tolérance face à l'administration d'un excès de calories (20). De nombreuses études

faites dans les années 70 et portant sur la dépense énergétique de base, ont conclu que le métabolisme de base de patients adultes brûlés peut représenter jusqu'à 200-300% des valeurs prédites par les formules (21). Les variations individuelles étant notables, l'estimation la plus précise de la dépense énergétique des patients brûlés demeure celle basée sur la mesure de la consommation d'oxygène par calorimétrie indirecte. Cette mesure, combinée à celle de l'excrétion urinaire d'azote et de la production de gaz carbonique, permet de déterminer la part respective des hydrates de carbone, des lipides et des protéines dans la dépense énergétique (15).

### **1.1.2 Réponse hormonale**

La réponse du système endocrinien à une brûlure grave comprend une augmentation de la production des hormones dites «de stress» (2) : le cortisol, les catécholamines, le glucagon, et une diminution dans la production des hormones sexuelles. Contrairement à l'humain, les souris montrent une réponse métabolique différente selon le sexe (22). En effet en période post-brûlure, une augmentation des concentrations des œstrogènes a été observée chez les souris femelles et cette augmentation a été associée à des taux élevés d'IL-6 et à la suppression des fonctions du système immunitaire (22,23). Chez l'humain, il existe également des perturbations au niveau de la sécrétion de l'hormone de croissance et dans les taux circulants du principal effecteur de l'hormone de croissance, l'IGF-1 (24-26).

Dans le cadre de cette discussion, une attention particulière sera portée sur le cortisol et l'IGF-1 car les deux démontrent des perturbations importantes chez les grands brûlés. De plus, ces agents exercent un effet marqué sur la réponse inflammatoire et la fonction du système immunitaire. En présence d'un stress sévère, la sécrétion de cortisol et d'autres glucocorticoïdes est significativement augmentée suite à l'action de plusieurs hormones et cytokines (27,28). Les taux élevés de cortisol libre urinaire et plasmatique rencontrés chez les patients brûlés témoignent également d'une hyper production de cette hormone suite à une brûlure thermique sévère (29). Cette hypersécrétion persiste pendant plusieurs semaines post-brûlure mais, elle est particulièrement prononcée durant

la première semaine (29). Chez l'humain, plus de 90% du cortisol plasmatique circulant est lié à la corticosteroid-binding globulin (CBG) tandis qu'une petite quantité se lie à l'albumine. La fraction libre du cortisol, la seule disponible pour les tissus, se situe normalement entre 2 et 4% (30-32). La CBG est une glycoprotéine monomérique possédant un site unique de liaison pour le cortisol (30). De part sa structure, elle fait partie de la famille des inhibiteurs de protéase (serpine) sans toutefois posséder d'action inhibitrice sur les protéases. La CBG est un substrat pour les élastases. Le clivage de la CBG par les élastases entraîne une diminution importante (10x) de son affinité pour le cortisol (31). Chez les grands brûlés, une diminution du taux circulant de CBG a été constatée ainsi qu'une augmentation parallèle de la fraction libre du cortisol, ce qui permet une augmentation de la quantité de cortisol disponible aux tissus (29). Il a été montré que la CBG agit comme une protéine négative de phase aiguë, diminuant en situation de choc septique chez l'humain (33), lors de conditions expérimentales d'inflammation (34) ou suite à une brûlure chez le rat (35). Même si le mécanisme expliquant cette diminution de la CBG est inconnu, des études *in vitro* ont montré que l'IL-6, une cytokine inflammatoire importante, serait un inhibiteur puissant de la synthèse de la CBG (36). En ce sens, l'action de l'IL-6 aurait lieu au niveau transcriptionnel en réprimant le promoteur de la CBG. L'augmentation de la production de l'IL-6, qui survient dès les premiers jours post-brûlure, pourrait être un des facteurs responsables de la diminution du taux circulant de CBG chez les brûlés (37). Outre la production importante d'IL-6, d'autres phénomènes liés à la réponse inflammatoire pourraient expliquer la diminution de CBG en période post-traumatique. En effet, l'induction d'une réponse inflammatoire systémique entraîne l'activation des neutrophiles et la production de médiateurs inflammatoires puissants, incluant les élastases. Ainsi, l'augmentation de la production des élastases par les neutrophiles activés pourrait être responsable de la diminution de la CBG post-brûlure. Enfin, considérant l'amplitude de la rétention liquidienne après une brûlure sévère, l'hypothèse d'une dilution engendrée par un déplacement de la protéine dans le compartiment extravasculaire ne peut être exclue pour expliquer la baisse de concentration de la CBG. Ainsi, la diminution de la CBG après une brûlure sévère a d'importantes conséquences sur la quantité de cortisol disponible pour les tissus et conséquemment, crée des



répercussions considérables sur les systèmes biologiques sensibles au glucocorticoïde tel que le catabolisme protéique musculaire, le système immunitaire et la cicatrisation des plaies.

### 1.1.3 *Métabolisme des glucides*

La production de glucose, la néoglucogenèse, est considérablement élevée après une brûlure (7,38). Cet état, appelé «diabète de stress», est caractérisé par une production de glucose supérieure à son utilisation tissulaire. L'hyperglycémie qui en résulte est engendrée par une augmentation disproportionnée des taux sériques de glucagon par rapport au taux d'insuline et par une diminution de l'utilisation en périphérie (39,40).

Suite à une brûlure sévère, une glycolyse rapide survient en raison des taux élevés de catécholamines, de glucagon et de l'hypercortisolémie causant ainsi une déplétion des réserves de glycogène. Suite à l'épuisement total de ces réserves hépatiques, le muscle squelettique devient, de par ces acides aminés, une source importante de substrats pour alimenter la réponse hypermétabolique. Finalement, il s'en trouve une atrophie notable du muscle squelettique périphérique causée par une augmentation du métabolisme protéique et de l'utilisation des acides aminés provenant des protéines structurales comme précurseurs pour la néoglucogenèse hépatique.

Bien que les extrémités non brûlées des patients utilisent principalement des lipides et de faibles quantités de glucose comme source d'énergie, les extrémités brûlées de ces patients métabolisent de grandes quantités de glucose en lactate et en pyruvate (41). Les patients brûlés présentent une captation hépatique significative de lactate et de pyruvate qui sont générés par le métabolisme anaérobie du glucose en périphérie. La synthèse hépatique de glucose est donc faite à partir de ces substrats. Ce glucose est ensuite réutilisé comme source d'énergie par les leucocytes et les fibroblastes présents dans les plaies brûlées (41). L'activité de cette séquence glucose-lactate-glucose, appelée cycle de Cori, est significativement élevée chez les patients brûlés. Comme nous l'avons mentionné précédemment, le tissu brûlé est le premier site responsable de cette

augmentation de la production de lactate, mais le processus inflammatoire systémique participe également à la production de lactate. La deuxième source de lactate provient du processus de désamination de l'alanine. En présence d'un stimulus catabolique, l'alanine est produite par le muscle et transporté vers le foie pour subir sa conversion en glucose. En fait, la quantité d'alanine produite par le muscle excède celle contenue dans le muscle. Par conséquent, la source la plus probable d'alanine est la transamination du pyruvate musculaire effectuée lors de la dégradation des acides aminés du muscle, affectant surtout les acides aminés branchés et amplifiant ainsi la perte nette de masse maigre (7,38).

Il est sans équivoque que le glucose constitue une importante source d'énergie pour le patient brûlé et des quantités appréciables sont nécessaires pour éviter un catabolisme protéique excessif. Cependant, le taux maximal d'utilisation de glucose par le patient brûlé est limité. En effet, le taux d'infusion tolérable qui n'entraîne pas de désordre pulmonaire est d'environ 5 mg/kg/min chez les brûlés.

#### **1.1.4 Métabolisme des lipides**

Plusieurs aspects du métabolisme des lipides sont altérés des suites d'une brûlure. L'augmentation des catécholamines, via une stimulation  $\beta_2$  adrénergique, produit une élévation significative de la lipolyse chez les brûlés (7,42). Cette augmentation de la réponse lipolytique crée une élévation des taux sériques d'acides gras libres et de glycérol. Par opposition à l'augmentation des acides gras libres, nous retrouvons une diminution de la concentration des acides gras liés à l'albumine. Ce phénomène s'explique par une diminution des taux d'albumine observés chez les patients brûlés (43). Il faut toutefois mentionner que l'augmentation du taux de production des acides gras libres n'est pas liée à une augmentation de l'oxydation des lipides. En effet chez les brûlés, près de 70% des acides gras libres sont simplement recyclés tandis que seulement 30% sont utilisés comme substrats, ce qui est relativement peu si on compare à un taux d'oxydation de près de 90% en situation de jeûne. Ce phénomène est associé à une production réduite, jusqu'à 50%, des corps cétoniques (44). L'altération de la

cétogénèse peut s'expliquer par l'hyper insulinisme subséquent à la brûlure (40). Considérant la diminution de l'oxydation des acides gras libres et la réduction de la production des corps cétoniques après une brûlure, la quantité de lipides exogènes pouvant être utilisés comme source énergétique est donc limitée. En effet, la plupart des acides gras plasmatiques subissent une ré estérification hépatique afin d'être retransformés en gras, processus qui requiert de l'énergie. Conséquemment, l'apport en glucides et en protéines doit être suffisant dans la diète du patient brûlé afin de prévenir un catabolisme protéique trop important.

Le métabolisme des acides gras par le système enzymatique de la cyclooxygénase est significativement augmenté chez les brûlés. Ce phénomène engendre une élévation du taux de production des éicosanoïdes incluant : les prostaglandines E (PGE) (immunosuppressives), les thromboxanes (vasoconstrictrices) et les prostacyclines (vasodilatatrices). Conséquemment, les patients brûlés présentent une augmentation des concentrations plasmatiques et tissulaires des thromboxanes et des PGE. Plusieurs évidences sont à l'effet que les concentrations élevées de prostaglandines seraient en partie responsables de l'immunosuppression subséquente à une brûlure et que des manipulations diététiques seraient bénéfiques pour le statut clinique des brûlés (45). Ce sujet sera élaboré à la section II.

### **1.1.5 Métabolisme des protéines**

La principale perturbation du métabolisme protéique après une brûlure consiste en une augmentation marquée et sévère de la dégradation protéique (46,47). La sévérité de la perte azotée est étroitement reliée à l'augmentation du risque de morbidité et de mortalité durant la phase aiguë de la brûlure (46,48). Le métabolisme protéique du brûlé se caractérise également par une augmentation du renouvellement protéique. Toutefois, le catabolisme des protéines dépasse largement le niveau des synthèses, expliquant ainsi la perte nette d'azote qui a lieu malgré la présence d'un support nutritionnel adéquat. Ainsi, les patients brûlés présentent un bilan azoté négatif qui se poursuit jusqu'à plusieurs semaines post-trauma (49).

À l'inverse du tissu adipeux, il n'existe aucune réserve de protéines dans l'organisme, chaque molécule de protéines ayant un rôle fonctionnel pour assurer l'homéostasie. Il n'existe donc pas de surplus de protéines dans l'organisme. Une perte de masse maigre supérieure à 15% de la masse totale entraîne un retard dans le processus de cicatrisation tandis qu'une perte supérieure à 30% en résulte dans une augmentation accrue des infections, une faiblesse généralisée, des ulcères de pression et une absence de la capacité de cicatrisation des plaies (50). Une perte de plus de 40% de la masse maigre est habituellement fatale. La protéolyse subséquente à un traumatisme thermique permet :

1. de répondre à l'augmentation de la demande en énergie ;
2. de répondre à l'augmentation du turnover des protéines (51) ;
3. de répondre à l'accélération de la néoglucogenèse depuis les acides aminés (49) ;
4. de satisfaire à la synthèse de collagène nécessaire à la réparation tissulaire ; et
5. de répondre à la production d'immunoglobulines.

Le mécanisme sous-jacent à cette protéolyse est mal connu. Toutefois, les hormones de stress, les cytokines et les oxydants figurent parmi les candidats responsables, du moins en partie, de cette perte protéique (46,47). Le muscle est la principale source d'azote libérée par l'organisme pour assurer la synthèse des protéines prioritaires. Des taux élevés d'excrétion urinaire de 3-méthylhistidine (3-MH) chez les patients brûlés (29,52), reflètent la dégradation de l'actomyosine qui est un phénomène biochimique significatif après la brûlure. Les acides aminés dérivés de cette dégradation sont utilisés à des fins de synthèse. Cette dégradation de l'actomyosine dans le muscle squelettique est augmentée non seulement par la brûlure mais par d'autres agents stressants tels que l'immobilisation (53), l'infection (54), l'acidose (55), le jeûne (56). Notons que le cortisol et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) sont les principaux activateurs des enzymes protéolytiques musculaires (2).

Suite à une brûlure, l'inévitable diminution des acides aminés intracellulaires constitue un signal déclencheur du catabolisme protéique. Ce phénomène amplifie donc le

processus de perte protéique post- brûlure. D'importantes quantités d'alanine, d'arginine, de glutamine et de leucine sont ainsi oxydées. L'alanine est principalement utilisée pour la production de glucose tandis que l'arginine et la glutamine sont des acides aminés clés impliqués dans une série de réactions métaboliques. À titre d'exemple, la glutamine joue un rôle dans la régulation du métabolisme azoté et dans l'homéostasie acido-basique, en plus d'être le substrat préférentiel des cellules à multiplication rapide (57-59) tandis que l'arginine favorise la réponse immunitaire et les synthèses protéiques et stimule les sécrétions hormonales (hormone de croissance, insuline) (60). Enfin mentionnons que l'arginine est le précurseur du monoxyde radicalaire ( $\text{NO}^\circ$ ) qui exerce une action vasodilatatrice au niveau de l'endothélium vasculaire et est responsable de l'activité anti-tumorale des macrophages (61). L'effondrement de la concentration musculaire de glutamine en situation d'agression sévère, en dépit d'une activation de la synthèse *de novo*, suggère que, dans certaines conditions, sa disponibilité puisse devenir insuffisante, d'où l'appellation d'acide aminé conditionnellement essentiel (62-65). Nous verrons plus loin l'importance de la glutamine en situations de stress.

## 1.2 RÉPONSE DU SYSTÈME IMMUNITAIRE

Les brûlures étendues (> 20% de la surface corporelle) constituent le plus grave des traumatismes pour un individu. Dans les jours qui suivent l'accident, une réaction inflammatoire généralisée se produit, dont la conséquence principale est l'augmentation de la perméabilité capillaire. La réponse de l'hôte face à un tel assaut dépendra de sa sévérité et de son étendue. La conséquence de cette augmentation de la perméabilité capillaire est le choc hypo volémique qui peut être mortel en absence d'une administration adéquate de fluides. Cette administration entraîne la formation d'un troisième espace liquidien, dont le volume est proportionnel à la gravité de la brûlure et constitue en moyenne un doublement de l'espace interstitiel (66).

Les traumatismes par brûlure constituent une menace constante pour l'organisme qui doit lutter contre plusieurs types d'agressions : invasion d'agents infectieux, challenges d'antigènes, traumatismes causés par les nombreuses chirurgies, l'excision et les soins des plaies (66). Suite à la réponse inflammatoire systémique, qui persiste pendant environ les dix premiers jours post-brûlure, se manifeste un état d'immunosuppression généralisé au cours duquel des infections systémiques surviennent. L'intensité de la réponse inflammatoire semble jouer un rôle important sur ce phénomène d'immunosuppression. Il est bien connu que le statut immunologique a un impact considérable sur la morbidité et l'incidence de mortalité des patients brûlés. En effet, cette phase infectieuse menace la vie du patient de deux manières, soit à cause de la survenue de chocs septiques, c'est à dire d'un collapsus cardio-vasculaire, soit à cause de la constitution d'un *syndrome de défaillance organique multiple*. Toutefois, les mécanismes sous-jacents responsables de l'immunosuppression sont encore mal compris. L'étude de ce phénomène soulève un grand intérêt scientifique afin d'améliorer l'état clinique des patients ayant subi des brûlures sévères.

Afin de bien comprendre et cerner la physiopathologie de la brûlure nous allons, dans un premier temps, décrire le processus inflammatoire systémique et, dans un deuxième

temps, discuter des mécanismes et des événements responsables de l'immunosuppression subséquente à la brûlure.

### 1.2.1 *Inflammation*

#### 1.2.1.1 Réponse inflammatoire : définition

L'inflammation est une réponse normale immédiate et transitoire à toute agression extérieure, qu'elle soit mécanique ou infectieuse. La réponse est organisée et complexe dans le but de permettre l'élimination des organismes étrangers et d'amorcer les premières étapes du processus de réparation tissulaire au site de la blessure. Le processus inflammatoire représente l'ensemble des réactions de l'organisme (vasculaires, cellulaires, tissulaires) provoquées par une agression, quelle qu'en soit la nature. Il implique à la fois les réactions non spécifiques et spécifiques du système immunitaire (67,68). L'inflammation succède dans le temps à l'agression qui, par les dégâts qu'elle provoque, réalise la lésion autour de laquelle se constitue le processus inflammatoire. À court terme, les quatre principaux signes de l'inflammation locale aiguë sont *la rougeur, la chaleur, la tuméfaction* et *la douleur*. Ces symptômes sont introduits par une série de médiateurs chimiques solubles libérés par les cellules endothéliales et immunitaires (cytokines, histamine, complément, quinines, prostaglandines) (69). La réaction inflammatoire peut être locale ou généralisée, selon la gravité de la blessure. En effet, par des mécanismes d'auto-entretien et d'amplification, la réponse inflammatoire peut s'accroître et entraîner un état pathologique. La réponse inflammatoire systémique est caractérisée par une augmentation considérable de l'activité du système immunitaire et inflammatoire. Elle est causée par une incapacité et/ou une inefficacité des mécanismes naturels de rétrocontrôle de l'organisme (67). Ces agents dits anti-inflammatoires sont constitués de cytokines, d'antagonistes de récepteurs, de formes solubles de récepteurs pour les cytokines ou de glucocorticoïdes. Le diagnostic d'une réponse inflammatoire systémique se fait à partir de signes cliniques qui sont la conséquence des changements pathophysiologiques sous-jacents à cette condition. Pour établir un tel diagnostic, deux ou plusieurs de ces conditions doivent être présentes (70) :

- Température corporelle  $> 38^{\circ}\text{C}$  ou  $< 36^{\circ}\text{C}$  ;
- Pulsation  $> 90$  battements/minute ;
- Rythme respiratoire  $> 20$ /minute ou  $\text{PaCO}_2 < 32$  mmHg
- Compte leucocytaire  $> 12\ 000/\mu\text{l}$ ,  $< 4000/\mu\text{l}$ , ou  $> 10\%$  formes immatures.

Plusieurs étapes caractérisent la réponse inflammatoire. Chacune ayant des fonctions spécifiques. Voyons brièvement chacune d'entre elles (66,69).

### 1.2.1.2 Réponse inflammatoire : étapes

1. Suite à la lésion survient une brève vasoconstriction qui est immédiatement suivie d'une vasodilatation des capillaires. La relaxation des cellules musculaires lisses dans l'inflammation et la vasodilatation qui en résulte sont sous le contrôle de substances produites par l'endothélium, telles que la prostaglandine (71) et le facteur endothélial de relaxation (72). L'activité de ces facteurs est potentialisée par le  $\text{TNF}\alpha$  et l'interleukine-1 bêta ( $\text{IL-1}\beta$ ). L'augmentation de la perméabilité capillaire se définit par l'extravasation de protéines et de sérum, via la contraction des cellules endothéliales, leur séparation les unes des autres et le passage trans-endothélial des leucocytes. Ce dernier phénomène comprend l'adhésion des leucocytes activés (polymorphonucléaires, lymphocytes, monocytes) aux cellules endothéliales, leur migration sur la surface de l'endothélium et leur passage entre les cellules endothéliales. Lors d'un stress sévère, le passage des leucocytes est augmenté par la contraction des cellules endothéliales (73). La famille des sélectines est impliquée dans ce transfert cellulaire à travers l'endothélium.

Cette première étape, que l'on nomme temps vasculaire initial, permet d'apporter au tissu blessé les éléments cellulaires et nutritionnels nécessaires à sa réparation. L'augmentation du débit sanguin vers le site blessé, accompagnée d'hypérémie locale, est responsable de *la rougeur* et *la chaleur* des tissus enflammés.



L'activité osmotique extra vasculaire augmente également dans les minutes qui suivent l'agression, provoquant ainsi rapidement de l'œdème. *La tuméfaction ou l'œdème* est causée par la fuite de protéines dans le liquide interstitiel, qui découle de l'augmentation de la perméabilité capillaire. Le processus de tuméfaction est responsable de *la douleur* par la compression qu'il exerce sur les terminaisons nerveuses. *La douleur* résulte également de la libération de toxines bactériennes, du manque de nutriments des cellules affectées par la blessure, de même que par les effets sensibilisants des prostaglandines et de la bradykinine.

2. L'activation du système de coagulation constitue la seconde étape du processus inflammatoire. Elle inclut la déposition de fibrine et l'accumulation de plaquettes activées à la surface de la plaie. Ainsi les débris cellulaires et bactériens sont captés par la matrice de fibrine. Les plaquettes activées sont les premières cellules à libérer, au site de la blessure, les cytokines requises pour l'activation des macrophages et des fibroblastes. De plus, les cytokines de l'inflammation, comme le  $TNF\alpha$  et l' $IL-1\beta$ , permettent l'inhibition de l'expression de la thrombomoduline et de la synthèse endothéliale de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène qui favorisent l'apparition du syndrome de coagulation intravasculaire disséminée (74).
3. Simultanément, les voies classiques et alternatives du système du complément sont activées. De cette activation, résulte une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité micro vasculaire. Bon nombre de médiateurs inflammatoires (histamine, sérotonine, quinine, métabolites de l'acide arachidonique et produits de la xanthine oxydase) est impliqué dans ce processus. Les composantes C3a et C5a du système du complément, le facteur plaquettaire 4, de même que de nombreuses parties constituantes des bactéries représentent des facteurs chimiotactiques pour les leucocytes. Les phénomènes de leucocytose, de margination et de diapédèse des leucocytes, initient la phagocytose des agents pathogènes et des cellules mortes. La mobilisation phagocytaire implique surtout les leucocytes polymorphonuclés.

4. Graduellement, les polymorphonucléaires sont remplacés par les macrophages. Ces derniers répondent aux mêmes agents chimiotactiques qui, lorsque activés, sont responsables de la majorité de la production de cytokines, essentielles pour la guérison des plaies. Les principales cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire sont le et, l'IL-1, l'IL-6 et l'interleukine-8 (IL-8). Les cellules activées du système immunitaire sécrètent également des enzymes protéolytiques et des radicaux libres dérivés de l'oxygène qui interviennent dans le processus de phagocytose de bactéries ou de tissus nécrotiques, permettant ainsi de défendre l'organisme et d'entamer le processus de guérison tissulaire et cellulaire.

### 1.2.1.3 Réponse inflammatoire systémique due à la brûlure

Tel que déjà mentionné, une brûlure sévère induit une réponse inflammatoire systémique. En fait, la brûlure comme telle constitue la principale cause de la réponse inflammatoire systémique chez les patients (70). L'événement crucial résultant d'une inflammation systémique est le dommage cellulaire. Dans les cas les plus sévères, ces dommages cellulaires peuvent mener à l'apparition du *syndrome de défaillance organique multiple* (« multiple system organ failure »). Les réponses humorale et cellulaire du système immunitaire sont impliquées dans ce processus pathologique dont le pronostic clinique est très pauvre chez les patients affectés (70). L'infiltration cellulaire, initiée par les médiateurs inflammatoires, débute avec l'arrivée des neutrophiles et des macrophages qui survient vers le quatrième ou le cinquième jour post-brûlure. L'inflammation systémique devient prééminente vers le septième ou le dixième jour post-brûlure, après l'arrivée des cellules inflammatoires au site blessé et la propagation des événements inflammatoires (75). La magnitude de l'inflammation systémique dépend non seulement du degré et la persistance de l'insulte thermique initiale, mais aussi de la réponse de l'hôte face à cette insulte. En effet, l'intensité de la réponse dépend non seulement de l'étendue de la brûlure, de l'âge et de la composition corporelle du patient, mais aussi de la réponse génétique préprogrammée du patient face à un traumatisme (66,67,70). Si cette réponse est incontrôlée, son action protectrice initiale devient auto-destructive.

#### 1.2.1.4 Cascade de cytokines inflammatoires

La réaction inflammatoire est initiée par une «alerte» chimique qui est caractérisée par la libération massive de médiateurs solubles dans le liquide interstitiel. Les médiateurs incluent les immunoglobulines, les protéines du complément et les cytokines. Les cytokines sont un important groupe de peptides et de protéines qui est impliqué dans la signalisation entre les cellules de l'organisme et le système immunitaire. Elles comprennent les interleukines, les interférons, les facteurs de nécrose tumorale, les facteurs de stimulation de colonies cellulaires et les facteurs de croissance. Le  $\text{TNF}\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6 sont les principales cytokines responsable de nombreux changements métaboliques. Plusieurs types de cellules peuvent produire ces cytokines. Parmi celles-ci nous retrouvons les cellules leucocytes phagocytaires, les lymphocytes T et B, les mastocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales (76-78). Généralement, les cytokines ne sont pas libérées de façon constitutive, elles sont induites lors d'un stress ou d'une infection. La complexité du réseau de cytokines est attribuable à leurs nombreuses sources cellulaires, leurs effets pleiotrophiques, à leurs actions agonistes et antagonistes, de même qu'à leur capacité de modifier la production des autres cytokines et celle de leurs récepteurs (79). De nombreuses évidences indiquent que les cytokines inflammatoires sont responsables des changements pathologiques associés à la manifestation d'une infection systémique (80). Après le traumatisme, les cytokines sont produites rapidement par les cellules de l'hôte au contact des micro-organismes étrangers ou de leurs produits (80). Les cytokines, surtout le  $\text{TNF}\alpha$  et l'IL-1, ont la capacité d'induire la production de nombreux facteurs pro-inflammatoires tels que les prostaglandines, les leucotriènes, le facteur d'activation plaquettaire (PAF), des protéases et des radicaux libres (anions superoxyde, monoxyde d'azote). La communication à l'intérieur de ce réseau de cytokines représente un aspect important de la régulation du système immunitaire. Ces cytokines peuvent soit agir directement ou soit indirectement en étant à l'origine d'une production en cascade de d'autres médiateurs essentiels à l'enclenchement et à l'entretien d'un état inflammatoire. La production des cytokines et des molécules oxydantes fait parti d'un mécanisme hautement efficace qui permet de créer un environnement hostile envers les pathogènes

qui envahissent l'organisme. Simultanément, d'autres acteurs sont produits pour limiter la production des cytokines pro-inflammatoires ou en contrecarrer les effets. Ces agents anti-inflammatoires comprennent des cytokines, des antagonistes de récepteurs et des formes solubles de récepteurs pour les cytokines ou des glucocorticoïdes. Une réponse harmonieuse sous-entend un équilibre réussi entre les cytokines pro-inflammatoires et les facteurs chargés d'en limiter la production et l'action. Or en absence de ce mécanisme de rétro-action négative, la très grande puissance des molécules pro-inflammatoires, qui est essentielle pour le système de défense de l'organisme, peut également être délétère pour l'hôte. En effet, par des mécanismes d'auto-entretien et d'amplification, la réponse inflammatoire peut s'accroître et entraîner un état pathologique (79,80). Voyons les fonctions des principales cytokines et leur implication dans la réponse inflammatoire systémique après une brûlure.

- Facteur de nécrose tumorale-alpha ( $\text{TNF}\alpha$ )

Le  $\text{TNF}\alpha$  est le principal médiateur endogène du choc endotoxique et de la réponse inflammatoire. De plus, il est directement relié au syndrome de défaillance multiple des organes chez les patients brûlés (67,81,82). Le  $\text{TNF}\alpha$  est la première cytokine à être sécrétée en réponse à un stimulus inflammatoire et il est le déclencheur de la production de plusieurs autres cytokines (IL-1, IL-6, IL-8). Parmi ces activités, notons qu'il augmente l'adhérence des leucocytes à la paroi endothéliale et qu'il stimule la phagocytose par les neutrophiles et les monocytes (83,84).

La sécrétion des cytokines inflammatoires se fait sous forme de cascade : la sécrétion de  $\text{TNF}\alpha$  entraîne celle de l'IL-1 et celles-ci agissent en synergie pour induire la sécrétion des interleukines 6 et 8 (66,67). Chez l'humain ou l'animal, une infusion de lipopolysaccharide (LPS) ou de bactéries à gram-négatif crée un état inflammatoire et entraîne une élévation rapide des concentrations plasmatiques de  $\text{TNF}\alpha$ . Celles-ci sont maximales environ 90 minutes après le challenge et diminuent rapidement par la suite. Une augmentation transitoire des taux de  $\text{TNF}\alpha$  circulants ( $> 540 \text{ pg/ml}$ ) est associée à

un pauvre pronostic chez les patients brûlés (85). Par contre, les taux absolus de TNF $\alpha$  ne sont pas corrélés avec l'étendue de la brûlure (86).

Outre l'induction d'une réponse inflammatoire et l'initiation de la cascade des cytokines inflammatoires, le TNF $\alpha$  possède plusieurs autres fonctions physiologiques :

1. Le TNF $\alpha$  est un agent pyrogénique puissant (79,81). L'induction de la fièvre se fait au niveau des cellules hypothalamiques via la synthèse des PGE de type 2 (PGE<sub>2</sub>) (79,81) ;
2. Le TNF $\alpha$  augmente l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire et des surrénales, provoquant ainsi une élévation de la sécrétion de la corticolibérine (CRF), de l'ACTH et du cortisol, respectivement ;
3. Il agit indirectement, via la synthèse de l'IL-6, sur les hépatocytes afin de favoriser la production des protéines de phase aiguë (80,81) ;
4. Le TNF $\alpha$  active la voie extrinsèque du système de coagulation : il altère l'équilibre entre les propriétés coagulantes et anticoagulantes de l'endothélium vasculaire en favorisant la production d'un facteur thrombogénique puissant, au détriment de la thrombomoduline (79,80) ;
5. Le TNF $\alpha$  exerce une activité catabolique sur la masse musculaire et la masse adipeuse. L'état cachectique, induit par cette cytokine, sert à mobiliser les réserves d'énergie nécessaires pour combattre l'infection systémique (68,79-81).

Le TNF $\alpha$  est une cytokine inflammatoire primordiale dans la défense de l'hôte contre l'infection. Il agit en synergie avec d'autres médiateurs afin de permettre à l'organisme de réagir afin d'assurer sa survie. Par contre, dans des situations où la concentration de TNF $\alpha$  devient très élevée, l'action de ce dernier sur les organes s'amplifie et peut s'avérer mortelle.

- Interleukine-1 (IL-1)

Plusieurs évidences supportent un rôle crucial pour l'IL-1 comme un co-médiateur dans l'induction de la réponse inflammatoire systémique et de la réaction de phase aiguë (67). Partageant de nombreuses activités, l'IL-1 et le TNF $\alpha$  agissent souvent en synergie. L'IL-1 et le TNF $\alpha$  sont directement à l'origine de processus délétères tels que l'ostéolyse, la dégradation du cartilage, la protéolyse musculaire, ou encore la nécrose tissulaire. L'administration d'IL-1 reproduit les mêmes perturbations hématologiques et métaboliques observées lors d'un état septique et il est autant si non plus puissant que le TNF $\alpha$  pour induire la production des cytokines subséquentes (66,67). Toutefois, la présence du TNF $\alpha$  est nécessaire pour l'induction d'un sepsis sévère, d'un choc septique, d'une défaillance d'organes multiples ou encore pour être létal (67). L'IL-1 joue un rôle important dans l'activation des lymphocytes T et B, des cellules à activités tueuses naturelles (NK), des cellules polymorphonuclées et des cellules endothéliales et musculaires lisses ; de plus, elle favorise l'adhésion des leucocytes à l'endothélium et participe à la synthèse des protéines de phase aiguë (66).

La présence d'une molécule ayant une forte homologie avec l'IL-1, fut découverte dans les années 1990. Cette molécule, l'IL-1 « receptor antagonist » (IL-1ra) se fixe aux mêmes récepteurs que l'IL-1, mais n'induit aucun signal d'activation cellulaire (87). Les cellules capables de produire de l'IL-1 sont également des sources potentielles d'IL-1ra (88,89). Mais il faut souligner que l'interleukine-4 (IL-4) et l'interleukine-10 (IL-10) qui inhibent la production d'IL-1, sont capables d'induire la production d'IL-1ra (90). De plus, il est intéressant de noter que les signaux anti-inflammatoires qui limitent la production d'IL-1, favorisent la production de l'IL-1ra. En situation post-traumatique, les concentrations d'IL-1ra augmentent dès les premières heures (66,67,91). L'IL-1ra réduit la létalité dans les modèles de chocs endotoxiques (92) et réduit les taux de TNF $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  circulants (93). Dans des modèles expérimentaux de chocs septiques, l'infusion exogène de TNF-Rs et d'IL-1Ra améliore le taux de survie et la performance hémodynamique des animaux (87). Le rôle précis de ces cytokines solubles et des récepteurs antagonistes est encore mal compris. Toutefois, la capacité de l'IL-1ra à

occuper les récepteurs de l'IL-1 sans déclencher aucune des activités induites par celle-ci est à l'origine d'une potentialité à réduire le choc hémodynamique, le choc septique et la réponse inflammatoire (87). Ainsi, la production de cette molécule après une brûlure participerait à la réaction anti-inflammatoire de l'organisme.

- Interleukine-6 (IL-6)

L'IL-6 est produite par une grande variété de cellules, incluant les lymphocytes T et B, les macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Elle agit en tant que stimulateur pour les cellules B et les hépatocytes, comme facteur de croissance pour les plasmocytes et enfin comme facteur de différenciation pour les cellules T cytotoxiques (67). Tout comme le et  $\text{TNF}\alpha$  l'IL-1, l'IL-6 est un agent pyrogénique endogène (67). L'IL-6 possède des activités multiples : l'IL-6 joue un rôle central dans la réponse hépatique de la phase aiguë et dans les mécanismes de défense et détient des propriétés à la fois inflammatoires et anti-inflammatoires (93b). Les patients brûlés présentent de fortes concentrations d'IL-6 (4,37,94-96). Les taux d'IL-6 plasmatiques sont étroitement associés avec la sévérité de l'agression, qu'elle soit traumatique, chirurgicale ou infectieuse (67). L'induction de l'IL-6 lors d'une brûlure est très rapide. Les taux d'IL-6 sont étroitement associés avec les paramètres cliniques de l'inflammation et le pronostic des patients brûlés (95). Chez les patients sévèrement brûlés, les valeurs maximales d'IL-6 ont été trouvées au quatrième jour post-brûlure. Par la suite, les concentrations élevées de cette cytokine ont été associées à des événements infectieux (37). Cette même étude a également trouvé une corrélation négative entre les concentrations d'IL-6 et les taux de CBG. Ces résultats appuient l'hypothèse voulant que l'IL-6 inhibe la production hépatique de cette protéine dans des conditions de stress sévère, laissant ainsi place à une augmentation considérable de cortisol libre disponible pour les tissus (37). Des évidences démontrent des activités immunodépressives exercées par de fortes concentrations d'IL-6 (97). En effet, des taux élevés d'IL-6 sont associés à une diminution des fonctions des cellules T et à une augmentation de l'apoptose des neutrophiles (97-99). Dans un modèle animal de brûlure, des taux élevés d'IL-6 ont été associés à la suppression de la réponse proliférative des splénocytes et de la réponse

d'hypersensibilité retardée (23). Dans cette même étude, l'administration d'un anticorps anti-IL-6 en période post-brûlure a rétabli partiellement la réponse d'hypersensibilité retardée et totalement la prolifération des splénocytes (23). Cette même équipe, celle de Kovacs et collaborateurs, a également démontré l'existence d'une différence dans la réponse immunitaire post-brûlure entre les animaux mâles et femelles qui s'expliquerait par les concentrations d'œstrogènes circulants (22). Les auteurs ont montré, tant par des expérimentations *in vivo* qu'*in vitro* effectuées chez des souris femelles brûlées, qu'une augmentation des concentrations circulantes d'œstrogènes est associée à une suppression des fonctions immunitaires et à une augmentation des taux circulants d'IL-6 (23). Selon ces résultats, les auteurs suggèrent que la différence entre les sexes dans la réponse à immunité cellulaire soit médiée par des différences de concentrations d'œstrogènes qui sont responsables de la modulation des cytokines immunomodulatrices produites par les macrophages. Ainsi, ces résultats démontrent que l'immunosuppression post-brûlure serait partiellement dépendante du taux circulant d'IL-6 produit par les macrophages activés et que la production de cette cytokine inflammatoire est, du moins chez les souris femelles, modulée par les concentrations d'œstrogènes. L'augmentation de la production de PGE<sub>2</sub> par les macrophages, induite par des fortes concentrations d'IL-6, a également été suggérée comme mécanisme d'action pour expliquer l'immunosuppression exercé par cette cytokine inflammatoire (98). Rappelons que les PGE<sub>2</sub> sont de puissants agents immunosuppresseurs et que leur concentration est largement augmentée après une brûlure (100,101). De plus, il a été noté que l'induction, par les macrophages, de la production des prostaglandines E<sub>2</sub> est en parallèle avec celle de l'IL-6 (102). Ainsi, les effets immunosuppresseurs de l'IL-6 s'exerceraient de façon directe et indirecte.

- **Interféron- $\gamma$  INF $\gamma$**

INF $\gamma$  est le plus étudié des trois groupes d'interférons (INF $\alpha$ , INF $\beta$ , INF $\gamma$ ). Il est produit par les lymphocytes T et les cellules NK de même que par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Parmi ses activités immunorégulatrices, nous retrouvons : l'activation des macrophages, des fibroblastes et des cellules musculaires lisses, la



différentiation des cellules T et B et l'induction de l'expression des antigènes de classe II (79). Il est également un inhibiteur de la croissance cellulaire et possède une faible activité antivirale. Pendant les premiers jours suivant la brûlure, les concentrations d'INF $\gamma$  sont en général difficilement détectables chez la plupart des patients; par contre, les taux de cette cytokine augmentent dès le cinquième jour pour atteindre des valeurs maximales au dixième jour et redescendent par la suite (66). Dans un modèle animal d'infection et de brûlure, l'administration pré-traitement d'INF $\gamma$  recombinant a significativement amélioré le taux de survie des animaux et diminué le taux de translocation hépatique et splénique comparativement au groupe contrôle qui n'avait pas reçu d'INF $\gamma$  (103). Les effets bénéfiques de l'administration d'INF $\gamma$  en pré-traitement pourraient relever d'une pré-activation des macrophages et du système immunitaire afin de permettre à ce dernier de répondre plus rapidement et plus efficacement à une agression ultérieure. Une autre étude a montré qu'à 10 jours post-brûlure, les taux d'INF $\gamma$  produit par les splénocytes d'animaux brûlés sont deux fois plus élevés que ceux des animaux non-brûlés (104). De plus, cette étude a également montré que la production d'INF $\gamma$  par les lymphocytes est dépendante de la production de l'IL-6 sécrétée par les macrophages activés par la brûlure. Ainsi, il semble que les concentrations d'INF $\gamma$  soient élevées pendant la phase active de l'inflammation et qu'elles diminuent par la suite avec l'atténuation de la réponse inflammatoire.

En résumé, les cytokines sont élaborées sous forme de cascade en réponse à un stress physique sévère. L'accélération de la cascade de cytokines est interdépendante de facteurs immunologiques stéroïdiens. L'action simultanée des cytokines inflammatoires (TNF, IL-1, IL-6) et des hormones catabolisantes sur la masse musculaire et adipeuse crée une redistribution des nutriments au profit des réserves périphériques. L'IL-6 et les glucocorticoïdes participent, à l'intérieur de la boucle inflammatoire, à l'induction du rétro-contrôle négatif des événements inflammatoires. Si cette rétro-action négative est absente ou insuffisante, les dommages cellulaires et tissulaires causés par l'inflammation augmentent grandement la morbidité et l'incidence de mortalité chez les patients. De plus, il semble que l'intensité de la réponse inflammatoire ait un impact considérable sur l'état d'immunosuppression sous-jacente à un traumatisme sévère.

C'est pourquoi il est capital de bien comprendre le phénomène et tous les médiateurs responsables de la réponse inflammatoire afin de diminuer l'immunosuppression qui s'en suit et, éventuellement diminuer l'incidence des infections chez les patients brûlés.

#### 1.2.1.5 Médiateurs secondaires de l'inflammation

En plus des endotoxines et des cytokines, plusieurs autres médiateurs sont impliqués dans l'inflammation. Parmi ceux-ci, nous retrouvons : les métabolites de l'acide arachidonique, le PAF, le NO et les radicaux libres d'oxygène.

- Métabolites de l'acide arachidonique

La libération des phospholipides membranaires, subséquente à la lésion tissulaire, est un des premiers phénomènes à survenir dans le processus inflammatoire. L'hydrolyse des phospholipides membranaires a lieu en réponse à une multitude de stimuli inflammatoires, endocriniens ou immunitaires. Constituant environ 20% des phospholipides membranaires totaux chez l'humain, l'acide arachidonique est le principal phospholipide hydrolysé et libéré. Les phospholipases A2 et C (PLA2 et PLC) sont les deux principales estérases membranaires impliquées dans l'hydrolyse de l'acide arachidonique (105). Suite à sa libération, l'acide arachidonique est métabolisée par une des deux principales voies enzymatiques : 1) la voie des enzymes cytoplasmiques cyclooxygénase qui est responsable de la production des PGE<sub>2</sub>, des thromboxanes (TXA<sub>2</sub>) et de la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et; 2) la voie de la lipoxygénase qui produit les leucotriènes (106).

#### 1. voie de la cyclooxygénase (COX)

##### a) Prostacyclines (PGI<sub>2</sub>)

Les PGI<sub>2</sub> sont les principales prostaglandines produites par les cellules endothéliales (107). Ses actions sont anti-athérogéniques et anti-thrombotiques; elles inhibent

l'agrégation plaquettaire en stimulant le système d'AMP-cyclique dépendant qui, dans les plaquettes, est inhibiteur. Les prostacyclines sont de puissants vasodilatateurs. Ils partagent également avec les prostaglandines plusieurs des activités dans la réponse inflammatoire (107). Il est intéressant de noter qu'il existe une corrélation positive entre les concentrations plasmatiques de prostacyclines et la sévérité du choc septique chez les patients (67).

#### b) Thromboxanes (TX)

Les TXA<sub>2</sub> sont le métabolite prédominant de la COX produit par les plaquettes. Les actions des thromboxanes sont à l'opposé de celles de la prostacycline. Les thromboxanes stimulent l'agrégation des plaquettes et ont des effets vasoconstricteurs profonds sur la microvasculature splanchnique et pulmonaire, provoquant ainsi une bronchoconstriction et une augmentation de la perméabilité membranaire (105,107). Suite à une brûlure, les taux de TXA<sub>2</sub> sont significativement augmentés dans les tissus brûlés de même que dans les liquides de plaies (66). Une telle augmentation des TXA<sub>2</sub> pourrait être responsable de la vasoconstriction et de l'ischémie locale des tissus brûlés (108).

#### c) Prostaglandines (PG)

De nombreuses cellules sont capables de produire des prostaglandines (surtout PGE<sub>2</sub>) sous l'action des cytokines inflammatoires (IL-1 et et) (109,110). Les prostaglandines de la série E et F sont les principales PG formées à la suite de l'activité des isomérases et des réductases (107). Les PG sont détectées dans pratiquement tous les tissus des mammifères et les effets engendrés par celles-ci diffèrent selon le type et la quantité produite et, selon les cellules productrices (66,107).

Les prostaglandines de la série E sont les métabolites de l'acide arachidonique les plus étudiés compte tenu de leurs propriétés pro-inflammatoires et immunosuppressives. Lors d'une réponse inflammatoire systémique, les PGE<sub>2</sub> sont sécrétées en grande quantité

(45,108,111). La brûlure étant un état de stress sévère caractérisé par une forte réponse inflammatoire, les concentrations de PGE<sub>2</sub> sont aussi très élevées chez ces patients (45,100,111). De nombreuses évidences expérimentales, *in vitro* et *in vivo*, démontrent les propriétés immunosuppressives des PG. Ainsi on leur attribue une importante part de responsabilités dans l'immunosuppression subséquente à une brûlure. Ces propriétés seront décrites en détails plus loin dans la discussion.

## 2. Voie de la lipoxygénase (LO)

### a) Les leucotriènes (LT)

L'activité de la 5-lipooxygénase entraîne la formation de deux types de LT qui diffèrent suivant leur métabolisme : les leucotriènes C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> et E<sub>4</sub>, qui renferment une composante peptidique, et les leucotriènes B<sub>4</sub> en sont dépourvus (112). Les LT sont générés par plusieurs types de cellules, incluant les neutrophiles, les macrophages et les monocytes (112). Notons que les parois vasculaires peuvent aussi, au besoin, produire des LT. Les LT C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> et E<sub>4</sub> exercent plusieurs actions sur le tonus vasculaire qui dépendent de la présence ou de l'absence de d'autres médiateurs de la voie de la cyclooxygénase (112). Ils provoquent également une augmentation de la perméabilité vasculaire. En effet, il a été démontré que le développement d'une défaillance pulmonaire est précédé d'une augmentation significative des LT C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> et E<sub>4</sub> (113). En contrepartie, l'effet dominant des LT B<sub>4</sub> est de favoriser le chimiotactisme des neutrophiles (112). Par conséquent, les groupes de LT pourraient être impliqués dans la formation de l'œdème et dans les changements vasculaires systémiques et pulmonaires qui sont observés dans le syndrome de défaillance multiple des organes.

- Oxyde nitrique (NO)

L'oxyde nitrique fut identifié au milieu des années 80 en tant que *facteur relaxant de l'endothélium* (endothelial-derived relaxing factor) (114). Le NO est un gaz lipophile qui pénètre aisément les cellules musculaires lisses afin de favoriser la synthèse de la

guanosine monophosphate cyclique (GMPc). De hauts niveaux de GMPc stimulent les cellules à diminuer la concentration de calcium intracellulaire. Ce phénomène favorise une dilatation vasculaire et la diminution de la réponse aux vasoconstricteurs et à la stimulation du système nerveux sympathique. La demi-vie du NO étant de très courte durée, il est rapidement oxydé et possède d'importants effets micro vasculaires. Le NO est synthétisé, via l'arginine, par une synthétase (l'oxyde nitrique synthétase). IL existe deux iso formes pour l'oxyde nitrique synthétase, une constitutive et l'autre inductible (60). La synthèse du NO est stimulée par plusieurs cytokines, endotoxines, thrombulines, de même que par des lésions de l'endothélium vasculaire. Le NO est un puissant vasodilatateur dont les actions varient selon le lit vasculaire et la présence des autres médiateurs inflammatoires (60). Il est un des principaux médiateurs de la réponse hypotensive survenant lors d'un sepsis (60). Le NO, produit en réponse à la stimulation cytokinique, exerce un effet bénéfique en améliorant la micro circulation hépatique et intestinale par une action anti-thrombotique, en piégeant les radicaux libres et en inhibant l'adhésion des neutrophiles sur l'endothélium (60).

- Radicaux libres

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques: phagocytose, chaîne respiratoire mitochondriale, etc. À faibles concentrations, les radicaux libres sont utiles à l'organisme car ils participent au contrôle de la transmission des signaux cellulaires en modulant les cascades de protéines kinases ou encore, ils contribuent à la destruction de cellules cancéreuses ou bactériennes. Toutefois, un déséquilibre entre la production de radicaux libres et leur destruction donne lieu à un excès de radicaux libres constituant ainsi le stress oxydatif. Ce dernier engendre une dénaturation des macromolécules biologiques (lipides, ADN, protéines), créant des lésions biochimiques difficilement réversibles (115). Parmi les radicaux libres formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxyde ( $O_2^-$ ) et le monoxyde d'azote (NO) sont les moins réactifs, mais ils constituent des précurseurs pouvant être activés en d'autres espèces plus réactives. En revanche, les radicaux peroxydes ( $ROO^+$ ) et hydroxydes ( $HO^-$ ) sont extrêmement réactifs avec la plupart des molécules des tissus vivants (116).

La très courte durée de vie de ces métabolites de l'oxygène les rend très instables, ainsi leur rôle patho-physiologique est difficilement démontrable. La méthode la plus utilisée pour évaluer le stress oxydatif consiste à mesurer le taux de peroxydation des lipides. *In vivo*, le meilleur marqueur biologique de la peroxydation des lipides est le dosage du malonalaldéhyde (MDA) présent dans les tissus ou dans les liquides biologiques. En effet, les lipides des organismes vivants, surtout ceux formés d'acides gras polyinsaturés dans les membranes cellulaires, sont particulièrement sensibles à l'oxydation. Les formes les plus réactives de l'oxygène (radicaux hydroxyles et peroxydes) peuvent initier directement la peroxydation des lipides (117). La formation des dérivés d'oxydation dans les couches lipidiques, perturbe la micro-architecture membranaire et altère les fonctions des enzymes et des transporteurs membranaires (118). En plus de causer des dommages cellulaires importants, ces réactifs entraînent une augmentation de la perméabilité vasculaire et favorisent la sécrétion des éicosanoïdes. En effet, les radicaux libres stimulent l'activité de la phospholipase A qui est responsable du déclenchement de la cascade de l'acide arachidonique. Ce phénomène a pour conséquence d'intensifier l'inflammation (105).

L'inflammation est une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées mais la nécrose cellulaire engendre également la production de radicaux libres. Lors de l'inflammation, les cellules phagocytaires activées sont le siège de l'explosion oxydative (oxydative burst) qui consiste à l'activation du complexe de la NADPH oxydase capable d'utiliser de l'oxygène pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes au niveau de la membrane cellulaire (119). Ce phénomène, impliqué dans la phagocytose, est capital dans la lutte anti-infectieuse, mais par ailleurs, il peut être responsable des lésions cellulaires importantes lorsqu'il n'est pas contrôlé adéquatement. Plusieurs évidences montrent que les radicaux libres de l'oxygène participent au développement de lésions organiques et tissulaires secondaires à l'ischémie et à la défaillance multiple des organes (120). Suite à une brûlure sévère, les radicaux libres sont impliqués dans plusieurs réactions patho-physiologiques (121). En effet, plusieurs auteurs ont démontré une augmentation

significative des produits de peroxydation de lipides plasmatiques après la brûlure (122-125). Certains ont également rapporté l'implication des radicaux libres au choc thermique et aux dommages pulmonaires subséquents à la brûlure (126,127). En plus d'être produits par les mécanismes spécifiques aux neutrophiles, les radicaux libres de l'oxygène sont également des sous-produits des cellules endothéliales lors de la transformation de l'hypoxantine en xanthine par l'enzyme xanthine oxydase. Ce phénomène fut relié à la pathophysiologie de la brûlure lors de la découverte d'une diminution des dommages oxydatifs, de la peroxydation des lipides et de l'inflammation suite à l'utilisation d'un inhibiteur de la xanthine oxydase, l'allopurinol (128). En effet, le plasma d'animaux brûlés montre une augmentation importante de l'activité de la xanthine oxydase, atteignant des valeurs maximales 15 minutes après le traumatisme (128). L'histamine a également été identifiée comme un promoteur de l'activité de la xanthine oxydase, établissant ainsi un lien entre l'histamine et la production de radicaux libres de l'oxygène (129). Rappelons que le rétablissement du flux sanguin dans les régions de stase, constitue également une source de production de radicaux libres. Ce processus survient lorsque les niveaux d'oxygène dans les tissus sont rétablis. Il implique des lésions de types ischémiques, entraînant ainsi une augmentation de l'activité de la xanthine oxydase. Ces résultats laissent croire que la sécrétion d'oxydants par les tissus brûlés est en partie responsable de la formation de l'œdème localisé, mais également de l'inflammation et de la sécrétion d'oxydants en périphérie. De plus, les lésions vasculaires définies par une augmentation de la perméabilité sont en partie reliées à l'activation de la xanthine oxydase et à la génération des métabolites toxiques de l'oxygène qui affectent les cellules endothéliales micro vasculaires (128).

- Histamine

L'histamine est contenue dans les granules des granulocytes basophiles et des mastocytes. Elle est libérée après un traumatisme mécanique ou encore en présence de certains microorganismes ou de substances chimiques libérées par les neutrophiles. Le principal rôle de l'histamine est de faciliter la vasodilatation locale des artérioles et d'augmenter la perméabilité vasculaire, ce qui favorise la formation d'exsudat.

- Facteur d'activation plaquettaire (PAF)

Le PAF, un phospholipide dépendant de la phospholipase A2, est un puissant médiateur du choc septique et de l'inflammation (130). Il exerce ses effets biologiques via l'activation de son récepteur. Ce phénomène entraîne la stimulation de la protéine kinase C et l'augmentation du calcium intracellulaire. On le retrouve dans la majorité des fluides biologiques et il est synthétisé par la plupart des cellules. La perméabilité microvasculaire est fortement augmentée par le PAF, provoquant ainsi des effets hémodynamiques négatifs sur la pression artérielle. Le PAF augmente l'agrégation plaquettaire et favorise l'activation des leucocytes (130). De plus, il stimule fortement le métabolisme de l'acide arachidonique. Ces activités ont lieu directement ou encore à travers la formation de métabolites toxiques de l'oxygène ou ceux de l'acide arachidonique (67). Des évidences démontrent une interaction entre le PAF et les facteurs de croissance hématologiques et les cytokines. De plus, le PAF participerait avec le  $TNF\alpha$  et l'IL-1 dans l'induction des activités toxiques de ces cytokines (131). Mentionnons enfin qu'il joue un rôle important dans la pathogenèse de l'arthrite rhumatoïde, de l'asthme, du choc endotoxique et dans le rejet aigu d'une transplantation rénale (130). Suite à une brûlure sévère, les taux de PAF sont augmentés et contribuent à l'augmentation de la perméabilité des capillaires (132).

### 1.2.2 *Immunosuppression*

Les résultats des études expérimentales et cliniques des 30 dernières années ont clairement démontré une diminution des fonctions immunitaires après une brûlure sévère (133-136). L'immunosuppression survient généralement dans les 10 jours après l'accident. Une atteinte profonde de la réponse immunitaire à médiation cellulaire a été démontrée à la suite d'une brûlure sévère (133-136). Des processus immunologiques non spécifiques tels que la phagocytose et l'explosion oxydative sont également altérés et sont associés à une neutrophilie importante (137-139) de même qu'à une augmentation du nombre de neutrophiles immatures (29). La fonction bactéricide des



macrophages est altérée (101) et des changements dans la sécrétion des immunoglobulines ont également été observés après une brûlure sévère (133,134). En fait, nous pouvons regrouper les principaux médiateurs de la dépression du système immunitaire après une brûlure en 4 catégories: 1) produits sécrétés à partir des tissus brûlés et relâchés en circulation (toxines cutanées, produits des neutrophiles, protéines dénaturées); 2) molécules immunorégulatrices endogènes (prostaglandines, interféron, corticostéroïdes); 3) substances immunologiquement actives provenant de sources exogènes (endotoxines bactériennes) et; 4) dépression immunitaire iatrogénique (nutrition, antibiotiques, analgésiques, produits sanguins).

La suppression globale des fonctions immunitaires entraîne irrémédiablement une diminution de la résistance aux infections et contribue au haut taux de complications infectieuses présent chez les patients brûlés. Sachant que la morbidité infectieuse est une des causes les plus fréquentes de mortalité chez les brûlés, il est donc important de bien connaître et comprendre les mécanismes sous-jacents à l'immunosuppression afin d'améliorer le statut clinique de ces patients. Plusieurs facteurs nutritionnels peuvent influencer le statut immunitaire des patients (111,140). Nous traiterons également à l'intérieur de ce chapitre des principaux facteurs nutritionnels pouvant affecter les fonctions immunitaires des grands brûlés.

#### 1.2.2.1 Lymphocytes T

Il existe un consensus dans la littérature pour admettre que la capacité fonctionnelle des lymphocytes T à exercer une réponse physiologique normale est modifiée après une brûlure. Plus spécifiquement, suite à une brûlure, les cellules T présentent une paralysie fonctionnelle dont l'intensité et la durée sont proportionnelles à la sévérité du traumatisme (141,142). Toutefois le moment précis de l'établissement de l'anergie des cellules T ne fait pas l'unanimité. Certains croient que l'anergie des lymphocytes T, rencontrée après une brûlure sévère, serait attribuable à une activation préalable du système lymphoïde (143,144), tandis que d'autres privilégient une incapacité intrinsèque et immédiate des lymphocytes T à générer des réponses après une brûlure sévère

(145,146). Parmi les aspects de la réponse immunitaire à médiation cellulaire affectés à la suite d'une brûlure, notons une forte diminution du rejet d'allogreffe, des réactions d'hypersensibilité retardée et également une diminution de la réponse proliférative induite par des mitogènes ou des antigènes (133-136). Une diminution du nombre absolu de cellules T est également associée à cette baisse de réactivité (142). Toutefois, une grande controverse entoure les mécanismes sous-jacents à ces altérations.

Un déséquilibre entre les cellules T auxiliaires ( $CD4^+$ ) et les T suppressives ( $CD8^+$ ) a été initialement tenu responsable de l'immunosuppression après une brûlure (133,147). Toutefois, certaines évidences favorisent la théorie d'une redistribution de la circulation lymphocytaire plutôt qu'une diminution absolue des cellules  $CD4^+$  et d'une augmentation des cellules  $CD8^+$ . En fait, la suppression du nombre total de la population lymphocytaire est la seule constance parmi ces études (148-150). Les cellules T  $CD4^+$  sont les cellules pivots de la réponse immunitaire adaptative. Elles jouent un rôle important dans l'établissement de la réponse cellulaire antigène spécifique de même que dans la formation d'anticorps. Il est maintenant démontré que la majorité des perturbations de la réponse immunitaire, après une brûlure, peut être attribuée à une altération de la fonction des lymphocytes T  $CD4^+$  (151). Depuis quelques années, un progrès considérable a été fait concernant les interactions entre les populations de cellules T et la sécrétion de cytokines. Sous certaines conditions, les cellules T  $CD4^+$  (T helper) peuvent se diviser en deux catégories fonctionnellement distinctes :  $T_H1$  et  $T_H2$  (79,152,153). Ces catégories se différencient selon leur profil de sécrétion de lymphokines et selon leurs activités biologiques. Les cellules  $T_H1$  se définissent par la production d' $IFN\gamma$ , d'IL-2 et de et. Ces cytokines sont les principaux effecteurs des réactions d'hypersensibilité retardée et de l'immunité à médiation cellulaire contre les microbes intracellulaires. Elles engendrent également l'activation des macrophages et des lymphocytes T cytotoxiques (79). À l'opposé, les cellules  $T_H2$  se définissent par la production d'IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 et d'IL-13 et celle des immunoglobulines. Les cellules  $T_H2$ , à travers la production d'IL-4, IL-10 et d'IL-13, défavorisent l'immunité à médiation cellulaire. Elles sont également impliquées dans les réactions allergiques. Ainsi, les  $T_H2$  sont principalement responsables de la défense non-phagocytaire de

l'hôte. L'interleukine-3, le TNF- $\alpha$  et le GM-CSF (facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages) sont à la fois sécrétés par les cellules de type T<sub>H1</sub> et T<sub>H2</sub> (150). En situation physiologique normale, il existe un équilibre entre les deux types de cellules T<sub>H</sub>, toutefois certaines conditions peuvent privilégier le développement d'un des phénotypes au détriment de l'autre. Les conditions de stimulation antigénique sont les principaux déterminants du profil de différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup>. En fait, trois facteurs participent à la transformation des cellules CD4<sup>+</sup> naïves en T<sub>H1</sub> ou en T<sub>H2</sub> : les cytokines, et la nature et la quantité d'antigènes. À titre d'exemple, l'exposition des cellules CD4<sup>+</sup> à l'IL-12 facilite la conversion des cellules au phénotype T<sub>H1</sub> tandis que la voie des T<sub>H2</sub> est favorisée par la présence de l'IL-4 (154-155). Les facteurs régulateurs de la différenciation des cellules T<sub>H</sub> ne sont pas encore complètement élucidés. Toutefois il est connu que l'expression différentielle d'un des deux phénotypes T<sub>H</sub> engendre l'inhibition et l'inactivation de l'autre : l'IL-10, produite par les T<sub>H2</sub>, supprime la prolifération des cellules T<sub>H1</sub> et leur production de cytokines (156) tandis que l'IL-4 favorise la prolifération des cellules T<sub>H2</sub> et inhibe celle des T<sub>H1</sub> (157). L'action de l'IL-4 sur la production de cytokines de type T<sub>H1</sub> se produit au niveau transcriptionnel et au niveau du signal généré par le récepteur des cellules T (158).

Sachant que les patients brûlés présentent un défaut dans les réactions d'hypersensibilité retardée et une diminution de la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ , qui sont des signes d'une diminution de l'activité des cellules T<sub>H1</sub>, plusieurs équipes se sont penchées sur ce phénomène comme étant un des facteurs responsables de l'immunosuppression subséquente à un assaut thermique. Chez les patients brûlés, la diminution de la production d'IL-2, d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$ , associée à l'augmentation de la production d'IL-4, suggèrent une diminution des fonctions des cellules T<sub>H1</sub> au profit des T<sub>H2</sub> (79,159,160). Ce profil de sécrétion de cytokines est associé à une diminution de la résistance aux infections et à l'immunosuppression subséquente à la brûlure. Toutefois, l'équipe de Lederer (146) a montré, dans un modèle animal de brûlure, une perte de la prolifération antigène-spécifique des cellules T au jour 10 lorsque ce même antigène était administré immédiatement après la brûlure. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'immunosuppression subséquente à la brûlure soit causée par l'induction d'un état

anergique généralisé des cellules T au lieu d'une dépolarisation de ces mêmes cellules. Par contre, ces mêmes études ont également montré une diminution de la production des cytokines produites par les lymphocytes T<sub>H1</sub> (IL-2 et IFN $\gamma$ ) présents dans le thymus et la rate d'animaux brûlés (146). Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que les fonctions des cellules T CD4<sup>+</sup> sont profondément affectées après une brûlure sévère; par contre, les mécanismes responsables de ce phénomène sont encore mal compris.

Des modèles expérimentaux et des études effectuées auprès de patients traumatisés ont montré une augmentation plasmatique des cytokines produites par les T<sub>H2</sub>, l'IL-4 et l'IL-10, après une stimulation polyclonale des cellules mononuclées (159,161-166). Plusieurs études (162,164,167), sauf une (168), ont montré qu'une augmentation de la production d'IL-10 était étroitement corrélée à la présence d'épisodes inflammatoires systémiques et/ou la présence d'événements septiques. Malgré l'impossibilité d'après ces études d'établir un lien causal entre la production d'IL-10 et le sepsis, des modèles expérimentaux de brûlure ont permis de démontrer, avec l'administration d'un anticorps anti-IL-10 immédiatement après la brûlure, le rétablissement d'une résistance immunitaire normale en réponse à différents modèles infectieux (167). Ces résultats suggèrent que la production précoce d'IL-10 après la brûlure, joue un rôle dans la diminution de la résistance aux infections qui se manifestent couramment dans ces conditions (164,167,166). Toutefois, des travaux récents de Lederer et collaborateurs (169) ont montré, à l'aide d'un modèle de brûlure utilisant des souris génétiquement déficientes en IL-10 (IL-10 [-/-]), que l'IL-10 n'est pas essentielle à la survie post-brûlure des animaux, et qu'elle n'est pas impliquée dans la modulation des fonctions des cellules T subséquentes à la brûlure, incluant la prolifération, la formation d'anticorps contre les isotypes T<sub>H1</sub> et la production des cytokines de type T<sub>H1</sub>. Par conséquent outre sa fonction anti-inflammatoire importante dans le rétablissement d'une réponse inflammatoire normale, le rôle précis de la production de l'IL-10 de même que l'importance du temps post-brûlure de sa sécrétion devront être élucidés.

Une autre récente étude de la même équipe a montré une diminution de la capacité des monocytes/macrophages à produire de l'IL-12 chez des patients et des animaux brûlés

(170). L'administration d'IL-12 dans un modèle expérimental a augmenté significativement le taux de survie des animaux brûlés et infectés. De plus ce traitement avec l'IL-12 a permis d'induire la production de médiateurs pro-inflammatoires importants pour la défense de l'hôte, tout en maintenant ou en augmentant également la production de l'IL-10.

En conclusion, ces résultats suggèrent que le déséquilibre dans la production des différentes cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires dans les jours suivants la brûlure puisse être responsable, du moins en partie, de l'immunosuppression engendrée par une brûlure sévère. De plus en plus d'évidences démontrent qu'une brûlure sévère engendre un changement de la réponse des cytokines qui mène à une prédominance du phénotype cellulaire  $T_{H2}$ . L'augmentation de la sécrétion des glucocorticoïdes, de la norépinéphrine et des prostaglandines  $E2$  serait impliquée dans ce phénomène privilégiant les cellules  $T_{H2}$  (171-174). Toutefois à ce jour, l'origine exacte des cytokines  $T_{H2}$  n'est pas complètement élucidée et nécessite d'autres investigations. Contrairement à la première hypothèse qui voulait que les cellules  $T_{CD4}^+$  étaient les principales responsables des perturbations de la réponse immunitaire après une brûlure, une implication importante des  $CD8^+$  a été récemment proposée. En effet, des études effectuées chez l'animal et chez l'humain ont démontré que les cellules  $T_{CD8}^+$  sont les principales sources de cytokines de type 2 suite à une brûlure, favorisant ainsi l'état d'immunosuppression (165,160).

D'autres facteurs peuvent être tenus responsables de la dysfonction du système immunitaire après une brûlure. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la présence des cytokines  $T_{H2}$  figure parmi les médiateurs potentiels de l'immunosuppression, mais nous retrouvons également l'action de l'oxyde nitrique (175) et celle des prostanoïdes (176-179). La forte relation établie entre les prostaglandines  $E2$  ( $PGE_2$ ) et les perturbations du système immunitaire suite à une brûlure repose sur plusieurs observations : 1) l'augmentation systémique de la concentration de  $PGE_2$  suite à une brûlure (179); 2) les macrophages isolés provenant d'organismes brûlés produisent d'importantes quantités de  $PGE_2$  (101,180); 3)

l'utilisation d'inhibiteurs de cyclooxygénase rétablit certains aspects fonctionnels des lymphocytes T (177,178) et enfin; 4) les cellules mononucléées provenant du sang de patients brûlés sont plus sensibles aux effets inhibiteurs de PGE<sub>2</sub> (178). Il semble que les effets inhibiteurs de PGE<sub>2</sub> sur les fonctions des lymphocytes T aient lieu via l'activation de l'adénylate cyclase et l'augmentation intracellulaire des taux d'adénosine cyclique monophosphate (AMPc) (181). Une augmentation des concentrations de PGE<sub>2</sub> et d'AMPc a pour effet de diminuer la prolifération des lymphocytes et de diminuer la production de l'IL-2 de même que l'expression cellulaire du récepteur (IL-2R) de haute affinité (182-185). De plus, il est intéressant de noter que l'expression de l'IL-10, qui engendre des effets immunosuppresseurs, est elle-même augmentée par des facteurs qui augmentent l'AMPc (i.e. PGE<sub>2</sub>, db-AMPc) (186).

Comme nous pouvons le remarquer, les perturbations des fonctions des lymphocytes T sous-jacentes à une brûlure sévère constituent un phénomène complexe et encore mal compris. Toutefois, compte tenu de son importance dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire, il est sans équivoque qu'une production inadéquate d'interleukine-2 (IL-2) est une composante fondamentale de l'immunosuppression après une brûlure (187-189). Elle est le principal facteur de croissance et d'activation des lymphocytes T et elle agit aussi comme agent d'activation pour les cellules NK et les macrophages (79,190). Suite à une brûlure sévère, la production d'IL-2 est significativement diminuée (187-189) et le degré d'inhibition de la production d'IL-2 augmente parallèlement au temps post-brûlure; menant ainsi à l'inhibition de la prolifération et de l'activation des lymphocytes T (188). Les mécanismes d'action responsables de cette diminution de la production d'IL-2 sont encore mal compris. Toutefois de récentes études attribuent la diminution de production de l'IL-2 à un défaut au niveau de la transduction des signaux intracellulaires qui précèdent la transcription génique (191). L'inhibition de la production d'IL-2 pourrait également être expliquée par les fortes concentrations de PGE<sub>2</sub> rencontrées chez les patients brûlés. Santoli et coll (192) ont montré que l'acide arachidonique inhibe de manière dose-dépendante la prolifération de lymphocytes circulants humains en réponse à l'IL-2. Le même effet a été obtenu en utilisant directement des PGE<sub>2</sub>. En fait, il semble que les principaux effets immunosuppresseurs

des PGE<sub>2</sub> aient lieu principalement via la diminution de la production de l'interleukine-2 par les lymphocytes (45). Or une étude effectuée à partir de cellules mononuclées isolées du sang de patients brûlés renfermant de fortes concentrations de PGE<sub>2</sub>, a montré que l'ajout d'un anti-COX (l'indométhacine) restaurait seulement partiellement la production d'IL-2 *in vitro* (193). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la production de l'IL-2 par les PGE<sub>2</sub> ne soit pas le seul mécanisme responsable de l'inhibition des monocytes. Des études phénotypiques effectuées sur ces mêmes cellules montrent une diminution de l'expression du récepteur à l'IL-2. Une autre étude a établi que l'addition d'acides gras polyinsaturés (dont AA) à des cultures de cellules T contenant de l'IL-2 exogène, diminue l'expression du récepteur alpha de l'IL-2 (IL-2R $\alpha$ ) sur ces cellules (194). On peut donc supposer que les PGE<sub>2</sub>, en plus d'inhiber directement la production de l'IL-2 par les lymphocytes, elles inhibent indirectement la prolifération des lymphocytes en limitant l'expression du récepteur cellulaire de l'IL-2. De plus, il a été démontré que les PGE<sub>2</sub> induisent une augmentation de l'AMPc intracellulaire et sont impliqués dans l'activation des protéines kinases C; suggérant une fois de plus l'action des PGE<sub>2</sub> sur plusieurs signaux intracellulaires nécessaires à l'activation des lymphocytes T (45).

Même si le défaut de production de l'IL-2 est indiscutable après une brûlure, il reste que le statut de l'expression de son récepteur demeure controversé. Néanmoins, des évidences ont établi que l'expression et la fonction de l'IL-2R étaient intacts après une brûlure (195). Toutefois, une augmentation de la forme soluble du récepteur alpha de l'IL-2 (sIL-2R $\alpha$ ) a été trouvée à la suite de lésions thermiques (145, 196,198). Une récente étude effectuée dans notre laboratoire a démontré que ce récepteur soluble (sIL-2R $\alpha$ ) est en réalité une forme tronquée du récepteur cellulaire (IL-2R $\alpha$ ) (145). Par contre, l'origine exacte de cette forme soluble est encore inconnue. La libération de sIL-2R $\alpha$  est un phénomène généralement associé avec une activation du système immunitaire. Des taux élevés de IL-2R $\alpha$  et de néoptérine, un marqueur spécifique de l'activité des macrophages, sont généralement associés à un pauvre pronostic dans plusieurs pathologies différentes (196,197,199,200). Chez les patients brûlés, la concentration du sIL-2R $\alpha$  est associée à l'immunosuppression mais, la présence de ce

récepteur ne semble pas expliquer les dysfonctions des cellules T présentes chez les patients brûlés (145). Cependant, de grandes quantités de sIL-2R $\alpha$  peuvent entraîner une compétition avec le récepteur cellulaire d'affinité intermédiaire pour lier l'IL-2. Par conséquent, par ce phénomène, des taux élevés de sIL-2R $\alpha$  pourraient participer indirectement à l'immunosuppression post-brûlure (145). En plus, plusieurs paramètres immunitaires peuvent être influencés par la présence de ce récepteur soluble et ainsi affecter indirectement l'immunosuppression (145).

### 1.2.2.2 Lymphocytes B

La phase effective de la réponse immunitaire humorale est assurée par les lymphocytes B, qui se différencient en cellules productrices d'anticorps (79). La fonction des cellules B après une brûlure est moins bien documentée que celles des macrophages ou des cellules T. La population de cellules B est soumise à plusieurs messagers et facteurs environnementaux qui sont eux-mêmes altérés par un assaut thermique. Néanmoins, l'évidence d'une relation directe entre une diminution de la réponse humorale et le développement d'un état septique a été établie (201). Paradoxalement, une augmentation du nombre de lymphocytes B dans le sang de patients brûlés a été observée (202,203). Cette dernière observation a été mise en relation avec une augmentation de l'IL-6 et une augmentation polyclonale des Ig sériques de type IgM et IgG (204,205), proposant ainsi une activation de ces cellules à la suite d'une brûlure sévère. Toutefois, l'induction ou la présence de marqueurs d'activation des cellules B (CD23) est néanmoins diminuée lorsque comparée à des individus sains (206,207). Ces résultats révèlent qu'une brûlure sévère peut occasionner une diminution de la capacité du lymphocyte B à maintenir une production normale d'anticorps sériques. Cependant, les taux circulants d'immunoglobulines ne reflètent pas l'état septique des patients.

### 1.2.2.3 Macrophages

Les monocytes/macrophages sont des cellules clés dans la réponse immunitaire en raison de leur capacité à produire des cytokines immunorégulatrices. Ils assurent un rôle critique dans le maintien d'une activité normale du système immunitaire (208).



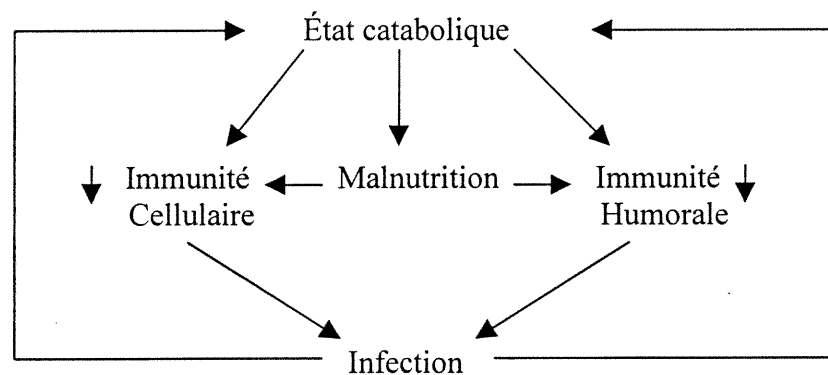
Toutefois, l'expression inadéquate de certaines fonctions effectrices des macrophages peut causer des préjudices sérieux à l'hôte. Il a été démontré que l'activation des macrophages pouvait entraîner des effets suppresseurs, via la production de métabolites de la cyclooxygénase, la production de  $H_2O_2$  ou encore via des mécanismes non-spécifiques qui affectent les fonctions des lymphocytes (209-212).

Suite à une brûlure, les macrophages et les monocytes semblent être activés de façon similaire aux lymphocytes. Les taux de néoptérine plasmatique, qui sont élevés après une brûlure, sont le reflet d'une augmentation de l'activation des macrophages (213,214). Il a été proposé que l'immunosuppression associée à la brûlure soit causée par la production de  $PGE_2$  par les macrophages (177,215) ou encore causée par la diminution de la production de l'interleukine-2 (187-189). Toutefois, l'utilisation d'inhibiteurs de la cyclooxygénase ne rétablit pas complètement l'immunodéficiences causée par la brûlure (216,217). Par conséquent, d'autres mécanismes sont impliqués dans l'induction de l'immunosuppression. On a récemment établi que la production de réactifs intermédiaires de l'azote par les macrophages entraîne l'inhibition des fonctions des lymphocytes *in vitro* (212,218-221). La production des métabolites de l'azote se fait via l'oxydation enzymatique de la L-arginine en L-citruline (61). L'activation des macrophages par l'infection ou par l'exposition à divers stimuli (LPS,  $INF\gamma$ ), entraîne une augmentation du métabolisme de l'arginine et une augmentation de la production des réactifs intermédiaires de l'azote (61). Or, l'augmentation de la production de ces réactifs est non seulement corrélée avec des effets immunosuppresseurs, mais également avec une augmentation de la cytotoxicité des cellules (61,212,220). Une augmentation des taux de NO a été notée chez les patients et chez les animaux brûlés (222-224). Des études récentes effectuées auprès de modèles expérimentaux ont démontré l'implication des métabolites réactifs de l'azote dans l'induction de la suppression des fonctions des lymphocytes T après une brûlure (175,225,226). Le retrait des macrophages dans les suspensions de cellules de la rate ou encore l'utilisation d'un inhibiteur de la  $NO_3$  dans les cultures cellulaires, rétablit la prolifération cellulaire. Or, ces résultats suggèrent que les macrophages, de par leur production de métabolites immunosuppresseurs,

contribuent de façon importante à la diminution des fonctions des lymphocytes T en période post-brûlure.

### 1.2.3 *Facteurs nutritionnels affectant le système immunitaire des patients brûlés*

Une brûlure sévère engendre un hyper métabolisme dont l'intensité et la durée varient selon l'étendue et la profondeur de la surface affectée, selon la présence d'infection et enfin, selon l'efficacité d'un traitement précoce. Cette augmentation de la dépense énergétique, conjointement à la réponse inflammatoire systémique, contribue au développement d'une malnutrition accompagnée d'une perte importante de masse musculaire (227,228). À son tour, la malnutrition a des répercussions nuisibles sur la cicatrisation (229), le système immunitaire (227) et la survie des patients si des apports insuffisants en énergie et en nutriments sont administrés. Le support nutritionnel est maintenant reconnu comme une composante essentielle dans le traitement des patients brûlés afin d'enrayer la constitution du cercle vicieux infection/malnutrition représenté par le schéma ci-dessous (228,230).



Malgré l'efficacité d'un support nutritionnel conventionnel dans la réduction de la mortalité (231), les mesures couramment utilisées sont limitées et mènent parfois à des déficiences pour certains cellules/tissus/organes en particulier. L'utilisation de la

nutrition pharmacologique a été recommandée afin d'augmenter les bénéfices de la nutrition clinique pour des pathologies spécifiques (232). Chez les patients brûlés, la composition du support nutritionnel influence également grandement l'évolution clinique. En effet, il est reconnu que des interventions nutritionnelles précises peuvent moduler la réponse du système immunitaire ; c'est alors que nous parlons d'immunomodulation nutritionnelle ou d'immunonutrition. Les apports en protéines, en lipides (quantité et qualité), en arginine et en glutamine de la diète sont les principaux agents immunomodulateurs faisant l'objet de recherches intenses auprès de patients traumatisés. La quantité totale de calories administrées, l'apport en nutriments spécifiques, la route d'administration du support nutritionnel et le statut nutritionnel du patient avant l'incident sont tous des facteurs qui possèdent un impact considérable sur les fonctions immunitaires des patients brûlés.

#### 1.2.3.1 Support nutritionnel

La nutrition entérale est la voie de choix à utiliser pour la plupart des patients brûlés. D'une part, parce qu'elle ne présente pas les risques septiques inhérents à la voie parentérale (233) et d'autre part, parce qu'elle maintient l'intégrité fonctionnelle de la paroi du tube gastro-intestinal en favorisant la sécrétion d'hormones intestinales et de facteurs de croissance (234). En effet, la nutrition entérale engendre une augmentation des sécrétions pancréato-biliaires, de l'activité neurale de l'intestin, du débit sanguin splanchnique, de même que des taux de glutathion; tous des facteurs qui facilitent directement ou indirectement la croissance entérocytaire (234,235).

Le moment où le support nutritionnel est initié est également décisif du pronostic des patients brûlés. Le début de l'alimentation dans les premières quarante-huit heures post-brûlure a montré d'importants avantages sur la cicatrisation des plaies et la durée de soins des patients, en plus de mieux satisfaire leurs besoins énergétiques (236). En fait, il semble que débiter le support nutritionnel dans les 6 premières heures suivant le traumatisme soit efficace et sans danger. Il permet ainsi de renverser plus rapidement la plupart des effets hormonaux et métaboliques causés par la brûlure (237). Plusieurs

études sont concluantes à l'effet que l'introduction précoce de l'alimentation entérale exerce un rôle protecteur de l'immunité et de l'intégrité de la paroi intestinale, avec pour corollaire possible une diminution de l'hyper métabolisme et de la translocation bactérienne (238,239). L'hyper métabolisme précoce après la brûlure pourrait être dû à un passage de toxines ou de métabolites bactériens à travers la paroi intestinale devenue perméable, avec majoration de la réponse inflammatoire. L'apport entéral précoce en nutriments pourrait limiter l'hyper métabolisme par un effet protecteur sur la muqueuse intestinale (240). Le rôle préventif de l'alimentation entérale pour la translocation bactérienne est bien démontré dans les modèles d'animaux brûlés (241,242). Cependant chez l'humain, ce phénomène reste à être prouvé.

### 1.2.3.2 Protéines

Comme nous l'avons vu précédemment, les pertes protéiques ont des répercussions importantes chez les patients brûlés; il paraît donc essentiel de remplacer quantitativement et qualitativement les pertes azotées par un apport suffisant en protéines. Dans les années 80, l'équipe d'Alexander a démontré les effets bénéfiques d'une diète riche en protéines sur l'état nutritionnel et les fonctions immunitaires des enfants brûlés (243). De façon plus remarquable, cette étude a également montré une amélioration du taux de survie et une diminution des complications infectieuses. Les apports recommandés en protéines pour les patients brûlés furent donc évalués aux environs de  $1.5 \text{ à } 3.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  avec un ratio de 100 : 1 d'énergie non protéique par g d'azote (244). Toutefois de récentes études ont remis en question la nécessité d'administrer de telles quantités de protéines (38). En effet, il semble que la synthèse protéique musculaire soit indépendante de l'apport en protéines (245) et que la déplétion protéique serait reliée à un défaut dans le transport des acides aminés et/ou encore à une activation de la voie ubiquitine-protéasome (38,246). Compte tenu de ces observations, un apport en protéines de  $1.5 \text{ à } 2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  serait suffisant après une brûlure (38). Des apports supérieurs ne feraient qu'accélérer le renouvellement protéique sans améliorer le bilan azoté (38).

### 1.2.3.3 Lipides

Un minimum de lipides doit être administré aux patients brûlés afin de prévenir une déficience en acides gras essentiels. Ces derniers ont leur importance pour le maintien des structures membranaires et pour assurer la biosynthèse des PG. Un apport d'environ 7 à 10% d'énergie non protéique sous forme de lipides est suffisant pour prévenir une déficience en acides gras essentiels. Des évidences révèlent que les lipides ne sont pas une source efficace d'énergie chez les patients sévèrement brûlés. En effet, des composantes de la molécule lipidique interfèrent avec plusieurs aspects de la fonction immunitaire (247). En s'incorporant rapidement dans les lipides membranaires de toutes les cellules, y compris les cellules immunitaires, les acides gras ont une influence marquée sur la fonction de celles-ci (247). Les acides gras de la série oméga-6, les principaux acides gras des phospholipides membranaires chez les mammifères, ont des propriétés immunosuppressives significatives qui sont en partie reliées aux métabolites de l'acide arachidonique. Les dérivés des voies de la cyclooxygénase et de la lipoxygénase participent à l'exacerbation de la réponse inflammatoire et réduisent les réponses immunitaires après une brûlure (111). De plus, il a été établi que les monocytes et les macrophages des patients brûlés produisent de grandes quantités de PGE<sub>2</sub> (100). Les PGE<sub>2</sub> sont particulièrement reconnues pour entraîner divers effets inhibiteurs sur le système immunitaire. La substitution des acides gras oméga-3 tels que l'acide éicosapentaénoïque et l'acide docosahexaénoïque au profit des oméga-6 entraîne la production de métabolites ayant une activité biologique plus faible et ayant moins d'effets inflammatoires (111). Généralement, on attribue des effets délétères sur les fonctions de système immunitaire lorsque les lipides de l'alimentation fournissent plus de 15% des calories non-protéiques (111). Les effets du type et de la quantité de lipides sur le système immunitaire seront détaillés dans le prochain chapitre.

### 1.2.3.4 Glutamine

En situation normale, la glutamine est un acide aminé non essentiel. Presque toutes les cellules de l'organisme possèdent l'enzyme glutamine synthétase, mais le muscle

squelettique représente la principale source de la production endogène de glutamine. La glutamine est l'acide aminé le plus abondant dans l'organisme, constituant plus de 60% du pool d'acides aminés libres. Étant donné que 80% du pool total d'acides aminés libres se retrouve dans le muscle squelettique, l'importance quantitative de la glutamine en tant que transporteur d'azote est énorme. En fait, la principale fonction du pool de glutamine, présent dans le muscle, est de maintenir le bilan azoté de l'organisme. La glutamine est le plus important précurseur pour la synthèse de l'ammoniac dans le rein et elle sert également de substrat pour l'uréagénèse et la néoglucogénèse hépatique. La glutamine est le substrat préférentiel pour toutes les cellules à haut potentiel prolifératif de l'organisme (cellules intestinales, cellules du système immunitaire) car elle fournit des groupements azotés pour la synthèse des acides nucléiques indispensables pour la multiplication cellulaire. En effet, les macrophages et les lymphocytes utilisent la glutamine comme substrat énergétique et comme intermédiaire moléculaire pour la synthèse de purine et de pyrimidine. Finalement, soulignons que la glutamine est un précurseur majeur du glutathion, qui est principalement synthétisée dans le foie, et qu'elle participe activement au maintien de l'homéostasie acide-base au niveau des reins (248,58).

La glutamine et l'arginine, en fournissant des groupements azotés pour la synthèse des acides nucléiques, sont des composantes essentielles pour la culture *in vitro* de leucocytes (249-253). De plus, la glutamine est un des principaux substrats, avec le glucose, pour les cellules immunitaires quiescentes. La production *in vitro* de l'IL-2 et INF $\gamma$  par les lymphocytes est dépendante de la glutamine (249,251,254). Une augmentation dose-dépendante de l'activité bactéricide et phagocytaire des neutrophiles et des macrophages a été observée avec l'ajout de glutamine *in vitro* (255,256). Enfin, des études *ex vivo* ont montré une augmentation de la réactivité des cellules T suite à une supplémentation en glutamine de la diète des souris (254).

L'infection et l'inflammation entraînent la libération de la glutamine depuis les réserves intracellulaires du muscle squelettique et la synthèse *de novo* par les poumons. En fait, l'activité de la glutamine synthétase présente dans les muscles squelettiques est

fortement régulée par les glucocorticoïdes et le stress (257). Toutefois, en situation de stress, l'augmentation de la production de glutamine est insuffisante pour maintenir des taux normaux de glutamine intramusculaire et par conséquent, la production est nécessairement insuffisante et ne peut pas satisfaire à la demande du système immunitaire et du lit splanchnique (258). En d'autres mots, la vitesse d'utilisation de la glutamine dépasse largement les capacités de synthèses en situation d'agression. Par conséquent, dans ces conditions, la glutamine devient un acide aminé conditionnellement essentiel.

Lors d'un traumatisme, la glutamine devient le principal substrat pour le lit splanchnique (259) incluant les entérocytes (260,261). L'augmentation de l'utilisation de la glutamine par l'intestin a mené à la théorie qui veut qu'une supplémentation en glutamine puisse diminuer la perte des propriétés mécaniques et immunologiques de l'épithélium intestinal, réduisant ainsi la translocation bactérienne et l'inflammation systémique (262-264). Notons également qu'en présence d'un état hyper catabolique, la glutamine est détournée au profit de la néoglucogenèse, ce qui priverait également les cellules immunitaires d'un de leurs principaux substrats. Plusieurs observations ont indiqué qu'une diminution des concentrations plasmatiques de glutamine est caractéristique de plusieurs conditions pathologiques, soit : après une brûlure (252,265), après une chirurgie (266-268), en présence d'un état septique (269) ou encore après un entraînement athlétique intense (270,271). Ainsi plusieurs auteurs ont suggéré que la diminution des apports des cellules immunocompétentes en glutamine puisse contribuer, du moins en partie, à l'immunosuppression sous-jacente à un traumatisme sévère (272,273). Une supplémentation en glutamine améliorerait donc le statut clinique et immunitaire des patients traumatisés (252,253,273,274). En effet, une supplémentation en glutamine pourrait améliorer la réponse clinique des patients ou diminuer la réponse métabolique au stress en augmentant la rétention azotée et la masse musculaire (275), en préservant l'intégrité de la muqueuse intestinale (276) et la perméabilité intestinale (277), en maintenant les fonctions immunitaires (139) et en réduisant l'incidence d'infections (274,278). Des récentes évidences suggèrent également qu'une supplémentation en glutamine préserve les taux de glutathion présent dans le foie et les

autres tissus (279). Chez des enfants brûlés, Ogle et collaborateurs (280) ont rapporté une amélioration de la fonction bactéricide des neutrophiles suite à l'ajout de glutamine lors de la stimulation *in vitro* cellules. Les effets positifs de la glutamine sur la fonction des neutrophiles s'expliqueraient par l'augmentation de la phagocytose et l'augmentation de la production de réactifs intermédiaires de l'oxygène (280-283). Ces résultats proposent un rôle important de la glutamine pour la prévention et le traitement des infections via son action sur les neutrophiles. Une étude clinique préliminaire, effectuée dans notre laboratoire, a démontré qu'une supplémentation en glutamine réduit la durée de soins et diminue l'incidence de mortalité chez des patients sévèrement brûlés. Les résultats sur les fonctions cellulaires de ces patients suivront dans un avenir rapproché. Il est clair que de nombreuses fonctions des cellules du système immunitaire dépendent de la glutamine; toutefois le mécanisme sous-jacent à ce phénomène est encore mal compris.



## 2. LIPIDES, EICOSANOÏDES ET SYSTÈME IMMUNITAIRE

Bon nombre d'évidences montrent que la quantité et le type de lipides de la diète jouent un rôle important dans la santé des individus. L'effet immunomodulateur des lipides a été initialement suggéré par les résultats d'études épidémiologiques associant une grande consommation de gras riches en acides gras polyinsaturés de type oméga-3 à une faible incidence de désordres inflammatoires et auto-immuns (284). Par la suite, des études cliniques ont rapporté les effets favorables d'une supplémentation en huile de poisson, contenant de fortes concentrations d'acide gras oméga-3, dans plusieurs conditions pathologiques inflammatoires (285-287). L'utilisation clinique potentielle des huiles riches en acides gras oméga-6 ou oméga-3 a encouragé les investigations et avivé l'intérêt portant sur les effets des acides gras et des lipides sur les fonctions des cellules immunitaires.

Les acides gras sont des composantes essentielles des membranes des cellules immunitaires et ils sont requis pour la croissance et l'homéostasie de ces cellules. Des résultats expérimentaux et cliniques ont montré que le type d'acide gras de la diète et la concentration totale de lipides dans la diète, ont tous deux une influence importante sur la croissance et l'activité des cellules immunitaires. La plupart de ces études ont montré qu'une réduction de l'apport total des lipides de l'alimentation améliore plusieurs paramètres du système immunitaire dans des situations physiologiques normales. Toutefois, les mécanismes d'action proposés sont nombreux et encore mal compris. Les principaux paramètres immunitaires affectés par les lipides sont : la synthèse des cytokines, l'activité des cellules NK, la phagocytose et la réponse inflammatoire. Des changements dans la fluidité membranaire, l'induction d'un stress oxydatif, la production d'éicosanoïdes et la régulation de l'expression de certains gènes, figurent parmi les mécanismes proposés pour expliquer la modulation des fonctions immunitaires par les acides gras (288). À l'intérieur de ce chapitre, nous décrivons les effets immunomodulateurs des lipides de l'alimentation, de même que les mécanismes potentiels associés.

## 2.1 BIOSYNTHÈSE DES ACIDES GRAS

Les acides gras jouent plusieurs rôles à l'intérieur de la cellule. Les principaux étant qu'ils sont une source d'énergie (289,290) et qu'ils sont des constituants essentiels des membranaires cellulaires (291). Ces rôles peuvent être remplis par tous les types d'acides gras. Toutefois, certains ont des propriétés spécifiques. Par exemple, les acides gras polyinsaturés (AGPI) oméga-6 (n-6) et les oméga-3 (n-3) sont des précurseurs pour les éicosanoïdes (292) tandis que les acides gras saturés (AGS) se lient de façon covalente avec certaines protéines et semblent jouer un rôle important dans le fonctionnement de ces protéines. Finalement, les acides gras insaturés jouent des rôles de second messager à l'intérieur de la cellule (293).

Les mammifères peuvent effectuer la synthèse *de novo* des acides gras saturés (jusqu'à l'acide palmitique (16:0)), mais cette synthèse est peu exploitée chez l'humain car la diète occidentale, dite « Western », comble amplement les apports en AGS. Toutefois, les membranes cellulaires nécessitent la présence d'AGPI pour assurer le maintien de leurs fonctions, de leur structure, de même que leur fluidité. Ainsi, au-delà de la conversion de l'acide stéarique (18:0) en acide oléique (18:1n-9) par l'enzyme  $\Delta 9$  désaturase, les tissus des mammifères sont incapables de synthétiser les acides gras polyinsaturés. Par conséquent, les acides gras linoléiques (18:2n-6) et  $\alpha$  linoléiques (18:3n-3) doivent provenir de la diète uniquement, ce qui en fait d'eux des acides gras essentiels (AGE). Rappelons que les séries n-9, n-6 ou n-3 des acides gras se caractérisent par la présence de la dernière de leurs doubles liaisons avec interruption *cis*-méthylénique au 9<sup>e</sup> au 6<sup>e</sup> ou au 3<sup>e</sup> carbone à partir du groupement méthyle terminal, respectivement. Les AGE servent de précurseurs *in vivo* pour la synthèse d'AGPI à chaîne longues. Après ingestion, une proportion des AGE procure de l'énergie à l'organisme et le reste des AGE est distribué parmi les triglycérides adipeux ou autre réserve tissulaire et parmi les lipides structuraux des organes. Dans l'organisme les AGPI sont oxydés plus rapidement que les AGS ou les acides gras monoinsaturés (AGMI). Par contre, les AGPI à longues chaînes dérivés des AGE (C20 :3n-6, C20 :4n-6, C20 :5n-3 et C22 :6n-3) sont moins facilement oxydables que les AGE. C'est

principalement au foie qu'a lieu le métabolisme des AGPI qui transforme les AGE contenant 18 carbones en AGPI à longue chaîne avec 20 ou 22 carbones, en faisant intervenir une succession d'élongations et de désaturations, tel que montré à la figure 1. Ces réactions consistent au retrait de deux atomes d'hydrogène des AGPI pour former une nouvelle double-liaison et de l'addition de deux atomes de carbones provenant du métabolisme du glucose pour allonger la chaîne de l'acide gras. Les désaturations sont catalysées par différentes enzymes ( $\Delta 6$  et  $\Delta 5$  désaturases) mais, ce sont les mêmes enzymes qui catalysent les étapes équivalentes dans les voies de transformation des acides gras n-9, n-6 ou n-3. Les familles d'AGPI interagissent de façon compétitive entre elle; de telle manière que les acides n-3 supprime plus fortement le métabolisme des acides n-6 que les acides n-6 ne suppriment les n-3. Toutefois les deux types d'acides, n-6 et n-3, peuvent, en agissant seuls ou ensemble, inhiber la biosynthèse de l'acide gras non-essentielle n-9. Les enzymes désaturases et élongases prédominent dans le foie, mais elles sont aussi situées dans le réticulum endoplasmique des cellules intestinales, cérébrales et rétinienne. Les AGE sont distribués de manière sélective entre les divers organes, selon leurs rôles structuraux et fonctionnels. À titre d'exemple, les acides gras n-3 sont concentrés dans les structures biologiques impliquées dans les mouvements rapides comme les mécanismes de transport du cerveau et de la rétine, tandis que ceux de la série n-6 sont distribués dans tous les tissus (294).

La  $\Delta 6$  désaturase constitue la première étape dans le métabolisme de bio transformation des AGPI. Cette bioconversion, qui est une réaction aérobie, prend place dans les membranes du réticulum endoplasmique. Pour initier la  $\Delta 6$  désaturation, la présence de l'Acyl-CoA est requise comme substrat. Ainsi à cette étape, l'acide gras linoléique C18:2n-6 se transforme en acide  $\gamma$  linoléique 18:3n-6 ou encore, l'acide gras alpha-linolénique C18:3n-3 est converti en C18:4n-3. L'étape suivante est l'élongation des chaînes d'acides gras. L'élongation microsomale des chaînes d'acides gras est un processus dépendant du Malonyl-CoA. Le Malonyl-CoA, dérivé du métabolisme du glucose, se condense avec l'Acyl-CoA préformé pour générer un dérivé  $\beta$ -keto. Ce dernier est immédiatement réduit en un deuxième alcool et une dernière réduction utilisant le NADPH mène à la formation d'un acide gras ayant 2 carbones de plus que

son précurseur. Étant donné qu'aucune molécule d'oxygène n'est requise dans le processus d'élongation, cette étape est habituellement pratiquée dans des conditions anaérobiques. Dans le métabolisme des AGPI, les vitesses de désaturation sont généralement plus lentes que celles associées à l'élongation des chaînes. La  $\Delta 5$  désaturase consitue l'étape finale dans la conversion de l'acide linoléique en acide arachidonique (AA; C20:4n-6) et de l'acide alpha-linolénique en acide C20:4n-3. D'autres séries d'élongations permettent la formations des AGPI à 22 et 24 C.

Les phospholipides des structures membranaires contiennent une forte concentration d'AGPI dont ceux contenant 20 et 22 carbones sont prédominants. L'AA, C20:4n-6, est le plus important et le plus abondant des AGPI à longue chaîne trouvé dans les phospholipides des membranes et, de plus, il est le principal précurseur des éicosanoïdes. La libération de l'AA initie une série de réactions métaboliques communément appelée la cascade métabolique de l'AA. La libération de l'AA est catalysée par une hydrolyse effectuée par la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). La PLA<sub>2</sub> se classifie en deux formes distinctes : la forme soluble (sPLA<sub>2</sub>) et la forme cytosolique (cPLA<sub>2</sub>). La cPLA<sub>2</sub> est exprimée sur plusieurs types de cellules, incluant les fibroblastes, les cellules mésangiales du rein et les plaquettes (295-297). La cPLA<sub>2</sub> démontre une préférence pour exercer l'hydrolyse de l'AA placé à la position sn-2 du squelette du glycérol (298). Ce phénomène justifie l'implication de cPLA<sub>2</sub> dans l'initiation des processus inflammatoires. En contre partie, la sPLA<sub>2</sub> n'a aucune préférence spécifique concernant la position ou le type d'acide gras à hydrolyser; ainsi son rôle consiste au maintient d'une homéostasie membranaire normale. La concentration de l'AA libre est sous la régulation étroite des phospholipases et des acyltransférases. La plupart de l'AA non acylée est liée à une protéine cytosolique. Les AGPI à longue chaîne sont majoritairement incorporés à la position 2-acyl des phospholipides des bi-couches plasmiques, mitochondriales et nucléaires. Après leur hydrolyse, les acides gras à 20 carbones peuvent être transformés en métabolites intracellulaires (inositol triphosphate [IP<sub>3</sub>] et diacylglycerol [DAG]) et extracellulaires (éicosanoïdes et facteur d'activation plaquettaire [PAF]). Le PAF et les éicosanoïdes, relargués par la PLA<sub>2</sub>, agissent à titre de médiateurs extracellulaires, tandis que la

phospholipase C (PLC) libèrent des médiateurs intracellulaires, le DAG et IP<sub>3</sub>, qui sont impliqués dans la transduction des signaux. Suite à la stimulation des récepteurs, le DAG et l'IP<sub>3</sub> agissent en tant que messagers intracellulaires qui permettent l'activation des protéines kinases C (PKcC) et la libération des réserves de calcium intracellulaire (299). L'activation des PKcC entraîne la transduction d'une grande variété de stimuli extracellulaire, qui mènent à la régulation de processus cellulaires tels que la prolifération et la différenciation.

La proportion relative entre l'AA et les autres AGPI à longues chaînes présents dans les phospholipides des tissus est importante en raison du fait que ces AGPI peuvent compétitionner ou inhiber une enzyme impliquée dans la formation des produits intracellulaires ou extracellulaires biologiquement actifs. La fluidité et autres propriétés physiques des phospholipides membranaires sont grandement déterminées par la longueur de la chaîne et le degré d'insaturation de leurs acides gras. Ces propriétés physiques peuvent affecter la capacité des phospholipides à exercer ses fonctions structurales, comme le maintien des activités normales des enzymes membranaires. Sachant que les AGPI de l'alimentation peuvent grandement moduler la composition en AGPI des lipides structuraux, nous pouvons supposer que la génération des produits intra et extracellulaires peuvent également être affectés par les lipides de l'alimentation (300).

## 2.2 SYNTHÈSE DES ÉICOSANOÏDES

Les acides gras essentiels servent également de précurseurs des éicosanoïdes. Les éicosanoïdes sont une famille de dérivés oxygénés des acides dihomog- $\gamma$ -linoléique, arachidonique et eicosapentaénoïque. Ils incluent les PG, les TX, les LT, les lipoxines et les acides hydroxyeicosatétraénoïque (HETE) et hydroperoxyeicosatétraénoïque (HPETE). Dans la plupart des conditions, l'AA est le principal précurseur de ces composés. Les éicosanoïdes produits par l'AA possèdent une activité biologique plus grande que celle produite par les deux autres acides. La quantité et le type d'éicosanoïdes synthétisés sont déterminés : a) par la disponibilité de l'AA qui dépend à la fois de la diète et de l'enzyme  $\Delta 6$  désaturase; b) par l'activité de la PLA<sub>2</sub> qui peut être moduler négativement par les glucocorticoïdes et par l'activité de la PLC; c) par l'activité de la COX qui peut être inhibée par les drogues anti-inflammatoires non stéroïdiennes (aspirine, ibuprofène, indométacine) et; d) par l'activité de la LO qui peut être inhibée par les antioxydants et les flavanoïdes (301).

La synthèse des éicosanoïdes se fait par l'entremise de deux voies enzymatiques différentes : la voie de la COX et celle de la LO. La COX produit les PG et les TX tandis que la LO induit la production des LT, de la lipoxine et des HETE et HPETE. L'AA est le substrat prédominant pour la COX. Par conséquent, la COX est l'enzyme clé pour la synthèse des PG à partir de l'AA. Il existe deux iso formes de COX : COX-1 et COX-2. Les deux iso formes ont une structure presque identique ; toutefois ils se distinguent de par leurs fonctions physiologiques (302). L'activité de la COX-1 est constitutive et présente à un niveau constant dans la plupart des types de cellules tandis que l'activité de la COX-2 doit être induite par un stimulus. La COX-1 est plutôt associée à la physiologie normale tandis que le deuxième iso forme est associé à un état pathologique. La plupart des médiateurs reliés à l'inflammation (IL-1, IL-2 et TNF- $\alpha$ ) ont la capacité d'induire l'activité de la COX-2. L'inflammation engendrée par la lipopolysaccharide (LPS) induit également l'activité de la COX-2. En contre partie, les cytokines anti-inflammatoires, IL-4, IL-10 et IL-13, de même que les glucocorticoïdes, diminuent l'induction de la COX-2 (303,304). En plus d'être induite dans les lésions

inflammatoires, la COX-2 est présente de façon constitutive dans le cerveau et dans la moelle épinière, où elle serait impliquée dans la transmission nerveuse, particulièrement pour l'induction de la fièvre et la douleur. La COX-1 induit la production de PG qui assurent l'intégrité des muqueuses épithéliales de l'estomac et de l'intestin et assure une fonction rénale normale (302). L'activité cellulaire de la COX-1 dépend de la disponibilité de l'acide arachidonique des phospholipides membranaires. La COX-2 est un enzyme inductible qui peut être exprimé par les macrophages activés (305,306), les fibroblastes (307,308) et plusieurs autres types de cellules (309-311). Par conséquent, les PG produites après un traumatisme thermique proviennent des suites de l'activation de la COX-2 et sont surtout des PG de la série 2.

La diète peut moduler la biosynthèse des éicosanoïdes formés à partir de l'AA en agissant de trois façons différentes. Premièrement, une diète déficiente en acides gras essentiels ou riche en l'isomère trans de l'acide linoléique, diminue les niveaux tissulaires d'AA en raison du manque de substrat et par conséquent, réduit la production de ses métabolites. Deuxièmement, il existe une inhibition compétitive entre les n-3, n-6 et n-9 pour les désaturases responsables de la synthèse des acides gras polyinsaturés dans les tissus (312). Ainsi, une augmentation des apports des acides gras de la famille n-3 dans la diète entraîne une diminution de la synthèse de l'AA dans les tissus. La troisième façon par laquelle les lipides de l'alimentation peuvent moduler la biosynthèse des éicosanoïdes se joue au niveau de leur site de formation. Par conséquent, des apports élevés en n-3 entraîneront nécessairement la formation d'un profil différent d'éicosanoïdes (PG et TX<sub>2</sub> de la série 3 et LT de la série 5) qui possèdent des activités biologiques qui leur sont propres. Ainsi, à travers la formation de métabolites hétérogènes, le type d'acides gras polyinsaturés présents dans la diète peut moduler la composition membranaire des cellules et par le fait même, entraîner des changements dans la réponse immunitaire.

La composition lipidique des monocytes, macrophages, lymphocytes et polymorphonucléaires reflète la composition en acide gras des lipides de l'alimentation (313-316). Ces cellules peuvent synthétiser tous les acides gras non-essentiels, mais ils

doivent puiser leurs sources d'acides gras essentiels à partir des lipides plasmatiques circulant dans le sang. Ainsi, les cellules immunitaires dépendent de l'activité de la  $\Delta 6$ -désaturase hépatique pour l'obtention de l'acide arachidonique (317). Conséquemment, les acides gras de la diète (quantité et qualité) affectent directement le taux de synthèse de l'acide arachidonique (318). Ce phénomène se révèle d'une grande importance compte tenu des effets qu'exercent les métabolites de l'acide arachidonique sur plusieurs composantes du système immunitaire.

Il est connu que des manipulations *in vitro* de la composition en acide gras des lymphocytes entraînent des modifications dans les fonctions immunitaires (319). Toutefois, ces modifications dépendent de la concentration et de la méthode de présentation des lipides aux cellules en culture. Des changements dans la quantité totale de lipides de la diète peuvent également entraîner des modifications dans la composition des phospholipides membranaires des lymphocytes (320-323).

Considérant l'intérêt de ce présent travail, nous discuterons brièvement des effets des différents types d'acides gras sur les fonctions des cellules du système immunitaire. Le corps de la discussion portera surtout sur les effets de la quantité des lipides de la diète sur le système immunitaire.



### 2.3 EFFETS *IN VITRO* DES ACIDES GRAS SUR LES FONCTIONS DES LYMPHOCYTES

Plusieurs études se sont intéressées aux effets d'un ajout de différents acides gras aux cultures cellulaires de lymphocytes. Les concentrations d'acides gras généralement utilisées se situent entre 30 et 300  $\mu\text{M}$ . On a comparé les effets des acides gras saturés (acides myristique, palmitique et stéarique), monoinsaturé n-9 (acide oléique), polyinsaturés n-6 (acides linoléique, arachidonique,  $\gamma$ -linoléique et dihomogamma-linoléique) et polyinsaturés n-3 (acides  $\alpha$ -linoléique, éicosapentaénoïque et docosahexaénoïque) (324-333). Bien que les AGS et les AGPI engendrent une inhibition de la prolifération des lymphocytes, les AGPI possèdent la plus forte activité inhibitrice et parmi ceux-ci, les plus inhibiteurs sont les acides gras de la famille n-3 (324,325,327,328,330,334). Ces études ont clairement démontré que les AGPI (n-6 ou n-3) inhibent plusieurs fonctions des lymphocytes, dont la prolifération (324-330), la production d'IL-2 (327-330), l'activité des cellules NK (331) et la présentation antigénique (332). L'inhibition de la prolifération des lymphocytes par les AGPI est dépendante de la concentration d'acides gras utilisée de même que du temps d'incubation des cellules en présence des acides gras (324,330). Enfin, la plupart des études s'entendent pour dire que la sévérité de l'inhibition dépend également, en partie, du degré d'insaturation et de la longueur de la chaîne de l'acide gras. Par ordre décroissant, la capacité inhibitrice des AGPI sur la prolifération des lymphocytes T est la suivante : l'acide éicosapentaénoïque, l'acide arachidonique, l'acide docosahexaénoïque, l'acide  $\alpha$ -linoléique et l'acide linoléique (324,325,327,328,334). La validité de ces résultats *in vitro* peut être critiquée en raison des fortes concentrations d'acides gras. En effet, l'utilisation de concentrations que l'on pourrait qualifier de non physiologiques peut, entre autre, biaiser les résultats en produisant des effets non spécifiques (335). Ces remarques sont soutenues par les études de Kelly et Parker (336) qui ont démontré que, contrairement à des concentrations élevées, l'ajout d'une faible concentration d'un acide gras insaturé (moins de 5  $\mu\text{M}$ ) augmentait la prolifération des cellules spléniques de souris. En fait d'après ces études il semble que, lorsque la

concentration d'un acide gras est excessive ( $\sim 10-15 \mu\text{M}$ ), ce dernier exerce des effets inhibiteurs (336).

Ainsi, ces résultats *in vitro* suggèrent qu'une consommation élevée d'AGPI, plus particulièrement de type n-3, puisse supprimer les fonctions des lymphocytes et du même fait, la réponse du système immunitaire. Toutefois, il est plutôt hasardeux d'émettre une telle extrapolation car il faut mentionner que les changements observés dans la réponse immunitaire, suite à des manipulations *in vitro* d'acides gras, ne reflètent pas nécessairement les changements *in vivo*, où les interactions entre cellules sont beaucoup plus complexes. De manière à obtenir des résultats plus convaincants et plus réalistes, les études subséquentes ont vérifié les effets des lipides de la diète sur les différentes fonctions du système immunitaire.

## 2.4 EFFETS *EX VIVO* DES LIPIDES DE L'ALIMENTATION SUR LES FONCTIONS LYMPHOCYTAIRES

### 2.4.1. *Études animales*

De nombreuses études se sont penchées sur les effets d'une variation dans la quantité de lipides de l'alimentation sur la prolifération lymphocytaire (337-349). Parallèlement aux résultats *in vitro* mentionnés précédemment, de fortes concentrations de lipides dans la diète induisent une diminution de la prolifération *ex vivo* des lymphocytes. La réduction des apports en lipides de la diète prolonge la survie d'animaux prédisposés à une maladie auto-immune et améliore la cicatrisation chez les rats soumis à un stress chirurgical (340,350). À l'opposé, une augmentation des taux de lipides dans la diète supprime la résistance aux infections dans plusieurs modèles d'animaux (351,352). Ainsi, une augmentation de la concentration des lipides de l'alimentation inhibe plusieurs fonctions des lymphocytes tandis que l'inverse s'applique lorsque les apports en gras sont diminués. Toutefois, les effets précis de ces diètes riches en lipides varient selon plusieurs facteurs incluant la concentration exacte et le type de lipides. En effet, tout comme les études *in vitro* l'ont démontré, le type d'acide gras prédominant dans une diète influencerait la capacité proliférative des lymphocytes.

Plusieurs études se sont penchées sur les effets des diètes hyper lipidiques riches en gras saturés (GS) (lard, suif, huile de palme, huile de coco hydrogénée) sur la prolifération des lymphocytes. Toutefois, les résultats observés dépendent du point de comparaison entre les différentes diètes. En effet, on a parfois comparé les diètes hyperlipidiques riches en GS à des diètes hyper lipidiques riches gras polyinsaturés (GPI) ou encore, on les a comparées à des diètes à faible teneur en lipides. Conséquemment, les effets spécifiques des diètes hyper lipidiques riches en GS sont difficiles à évaluer. Certaines études n'ont révélé aucun effet d'une diète hyper lipidique riche en GS lorsque comparée à des diètes à faible teneur en lipides (337,341,344) tandis que d'autres ont montré que des diètes hyper lipidiques et riches en GS sont inhibitrices, mais à un degré moindre que celles riches en GPI (339,340,342,347,349,353,354). Enfin, d'autres n'ont démontré

aucune différence significative entre les diètes hyper lipidiques riches en AGS et en AGPI (338,352,355-358). Comme nous pouvons le remarquer, les résultats de ces études divergent les uns des autres et, il est donc difficile de conclure clairement sur les effets des diètes riches en AGS sur les fonctions lymphocytaires. De plus, il semble qu'à l'intérieur même de la famille des GS, les effets sur la prolifération des lymphocytes varient selon le type d'acide gras prédominant. En effet, on a récemment démontré que la prolifération des lymphocytes est affectée par la nature du principal acide gras saturé de la diète (acide palmitique vs acide stéarique et laurique) (358). Cette observation démontre la complexité des effets de la composition de la diète sur les fonctions du système immunitaire.

De nombreuses études ont évalué les effets des diètes riches en GPI de type n-6 (huile de soya, maïs, tournesol) sur la prolifération des lymphocytes. Plusieurs ont rapporté une diminution de la réponse mitogénique des lymphocytes T suite à l'administration d'une grande quantité de GPI (huile de maïs ou de tournesol) comparativement à des gras riches en GS dans l'alimentation des animaux (337-341,347,349,353,354,356). Une fois de plus, ces résultats ne sont pas unanimes car une absence d'effet sur la prolifération des lymphocytes a également été observée par plusieurs, suite à l'administration de diètes riches en acide linoléique (344-346,355). Notons que des résultats aussi divergents ont été observés en ce qui concerne les effets des gras monoinsaturés et polyinsaturés de type n-3 sur les fonctions des lymphocytes. Chez les animaux, une déficience en AGE (< 1% d'acide linoléique) augmente la blastogénèse, la mitogénèse et accélère le rejet d'allogreffes de peau (320,338,359-361). Par contre, ce type de diète entraîne une diminution de la production d'anticorps et un délai dans la réponse d'hypersensibilité retardée mais, ces effets sont réversibles (359,362). Le taux de maturation des lymphocytes est toutefois plus grand chez les animaux ayant reçu un minimum d'acides gras essentiels, mais il varie de façon inversement proportionnelle avec l'augmentation de la concentration en AGE. Ainsi, de hauts taux d'AGPI suppriment les fonctions des lymphocytes tandis qu'une déficience en acide linoléique intensifie la réponse mitogénique (363).

Globalement les données de la littérature indiquent que :

1. Comparativement aux diètes faibles en lipides, les diètes hyper lipidiques sont davantage inhibitrices.
2. Parmi les diètes hyper lipidique, le degré d'inhibition de la prolifération des lymphocytes varie comme suit (301) :

Gras saturé < huiles polyinsaturées n-6 < huile moninsaturée < huile polyinsaturées n-3

Il faut toutefois mentionner qu'il existe une variation dans le degré d'inhibition rapporté par le même type d'huile utilisée dans des études différentes. Des différences d'ordre méthodologique expliqueraient la divergence de ces résultats (301). En effet il a été montré que les résultats sur les fonctions des lymphocytes sont fortement influencés par différents paramètres expérimentaux : la teneur totale en lipides de la diète, le temps d'administration de la diète, le niveau de comparaison entre les diètes (hyper lipidique vs hypo lipidique ou hyper lipidique vs hyper lipidique), la lignée d'animaux choisie, la provenance anatomique des lymphocytes étudiés, le type et la concentration des mitogènes utilisés, de même que le type de sérum utilisé pour la culture des lymphocytes (341,347,355,364).

L'étude de Lockniskar et collaborateurs (341) a bien démontré que la quantité et la qualité des lipides présents dans la diète, de même que la durée totale d'administration de la diète avaient des effets significatifs sur la prolifération des cellules de la rate. Chez des animaux nourris pendant 2,5 mois avec différentes diètes, on a montré que l'administration d'une diète riche en lipides (25% du poids total sous forme de lipides) diminuait significativement la réponse mitogénique des splénocytes en culture comparativement aux animaux nourris avec la diète contrôle contenant 5% du poids total. De plus, les auteurs ont observé une différence significative dans la capacité de prolifération des cellules entre les différents types de gras : parmi les diètes riches en lipides (25%), les AGPI ont montré plus d'inhibition que les AGS, mais cette différence disparaissait après 5 mois d'administration de la diète. Cette étude confirme que les diètes hyper lipidiques et celles riches en AGPI ont des activités inhibitrices sur les

lymphocytes. Toutefois, contrairement à l'effet de la concentration des lipides de la diète, l'effet différentiel des types de gras disparaît avec le temps. Ce phénomène suggère une capacité d'adaptation de l'organisme selon le type d'acides gras qu'il reçoit de son alimentation.

Les différentes conditions de culture utilisées dans les études peuvent également expliquer la divergence des résultats quant aux effets des lipides sur les fonctions immunitaires. En effet, il semble que les changements dans la composition en acides gras des lymphocytes, obtenus par les manipulations diététiques, sont maintenus favorablement lorsque les cellules sont mises en culture avec du sérum autologue plutôt qu'avec du sérum de veau fœtal (348). L'influence du type de sérum utilisé sur les résultats des tests de prolifération lymphocytaire semble être le principal facteur responsable de la divergence des résultats dans la littérature et, particulièrement ceux touchant les effets des AGPI de type n-3 ou n-6. Effectivement, il semble que l'utilisation du sérum de veau masque complètement les effets différentiels des différents types d'acide gras sur les fonctions des cellules car celles-ci emprunteraient le profil d'acides gras représentatif de la diète du veau (347). Ainsi, l'absence d'effet observée dans plusieurs études, entre les différents types d'huiles, pourrait être expliquée, du moins en partie, par l'utilisation de sérum de veau dans les cultures cellulaires (344,346,365,366). Toutefois, l'utilisation de sérum autologue perd de son importance dans les études qui évaluent les effets de la quantité totale de lipides sur les fonctions cellulaires.

Il est également important de souligner qu'en plus du fait que la quantité totale de lipides varie énormément d'une étude à l'autre, l'expression de cette quantité est également divergente; participant ainsi à la confusion des résultats. En effet, pour certaines études, le contenu total en lipides est exprimé en fonction du poids total de la diète (ex : 25% du poids total est constitué de lipides = 25% lipides) tandis que pour d'autres, cette quantité est exprimée en pourcentage de l'apport énergétique total de la diète (25% de l'énergie sous forme de lipides). Lorsque 25% du poids total de la diète est constitué de lipides, cette diète contient réellement 45% des calories sous forme de

lipides. Par conséquent, ces diètes sont fondamentalement plus hyper lipidiques qu'elles ne le laissent croire lorsqu'elles sont exprimées en % du poids total et, leurs actions sur le système immunitaire sont aussi, certainement, différentes. Ainsi, la comparaison entre les études devrait se faire après correction de l'apport énergétique.

Des études *ex vivo* ont suggéré que les effets des acides gras sur le système immunitaire dépendent principalement de la concentration de ces derniers dans la diète (288). Même s'il existe un gradient dans les niveaux de suppression parmi les différentes diètes hyper lipidiques, il n'en demeure pas moins que le degré d'inhibition de ces diètes augmente parallèlement avec la concentration totale de lipides dans la diète. Plus la concentration d'un acide gras est élevée dans la diète (diète hyper lipidique), plus l'effet inhibiteur de ce dernier est intense sur la prolifération des cellules (358,367,368). Toutefois, tel qu'observé *in vitro*, il semble qu'au-delà d'une certaine concentration de lipides dans la diète, les effets différentiels entre les différents types de gras sur la prolifération s'atténuent. En d'autres mots, à forte concentration, les lipides de la diète inhiberaient la prolifération indépendamment du type de lipides. L'équipe de Yaqoob et coll (347) a montré que la prolifération des splénocytes de rats nourris avec une diète hypo lipidique (2% lipides) est significativement plus élevée comparativement à des diètes hyper lipidiques contenant 20% (poids) de différents types de lipides (saturés, polyinsaturés n-6, n-3). Cependant, malgré une inhibition plus élevée des huiles contenant des acides gras n-3 (primrose et huile de poisson), les effets différentiels entre les GS et GPI de type n-6 sont moins évidents à ce niveau de concentration de lipides dans la diète (20%). Par contre, avec cette même concentration de lipides dans la diète (20%), une autre étude a trouvé un effet différentiel d'inhibition entre les AGS et les AGPI (367). Des différences dans la lignée d'animaux choisie et dans la durée d'administration de la diète (10 sem vs 8 sem) peuvent expliquer la divergence des résultats entre les deux études. Malheureusement, aucune étude n'a jusqu'à maintenant évalué la cinétique de plusieurs concentrations de différents lipides de la diète sur la prolifération des cellules, effectuée dans des conditions optimales de culture. Certes, la quantité totale de lipides présente dans la diète des animaux exerce un rôle important sur le système immunitaire. Ce phénomène étant démontré par la suppression grandissante des fonctions des

lymphocytes avec l'augmentation de la concentration lipidique. Ceci laisse supposer qu'il y ait au moins un mécanisme d'inhibition commun entre les différents types de gras et que ce mécanisme soit relié à un phénomène indépendant des éicosanoïdes (193,301).

#### 2.4.2. *Études chez l'humain*

Chez l'humain, des études de consommation ont montré qu'une réduction des apports totaux en gras (une baisse de 40% à 25% de l'énergie totale) augmente grandement la prolifération des lymphocytes circulants en réponse à différents mitogènes. (369,370). Ces mêmes études ont montré que l'administration de diètes hypo lipidiques, à l'intérieur desquelles différentes concentrations de gras polyinsaturés n-6 ont été étudiées, n'a entraîné aucun changement dans la prolifération des cellules T chez des volontaires sains (369,370). De plus, confirmant les résultats *in vitro* et *ex vivo*, une supplémentation en gras polyinsaturés oméga-3 a entraîné une diminution de la prolifération des lymphocytes périphériques chez des sujets sains (371-373). Ainsi, les résultats des études effectuées chez l'humain appuient ceux des études expérimentales en démontrant qu'une quantité importante de lipides totaux dans la diète altère les fonctions des lymphocytes.



## 2.5 EFFETS *EX VIVO* DES LIPIDES DE L'ALIMENTATION SUR LES FONCTIONS DES AUTRES CELLULES IMMUNITAIRES.

- Cellules à activités tueuses naturelles (NK)

Les cellules NK réagissent de façon semblable aux lymphocytes: comparativement aux diètes faibles en gras, les diètes hyper lipidiques diminuent l'activité des cellules NK. La capacité inhibitrice varie selon le type d'acides gras majoritairement présents (saturés < polyinsaturés n-6 < huile d'olive < huile de lin < huile poisson) (353,358,374). Les études chez l'humain ont également montré qu'une diminution des apports en lipides de la diète est associée à une augmentation significative de l'activité des cellules NK (375,376).

- Macrophages et neutrophiles

Plusieurs études rapportent que les activités des macrophages et des neutrophiles sont également affectées par les lipides de l'alimentation. Toutefois, les résultats ne sont pas unanimes. Certains ont montré que l'administration de diètes riches en lipides diminue l'activité phagocytaire et la production de  $H_2O_2$  et  $O_2^-$  des macrophages péritonéaux de souris (377) tandis que d'autres ont remarqué une augmentation proportionnelle de la phagocytose avec la concentration en gras polyinsaturés n-6 (346,378,379) et, inversement proportionnelle avec celle des n-3 (53). Enfin, une diminution de l'activité tumoricidale des macrophages isolés de souris a été observée suite à l'administration de diètes enrichies en acides gras polyinsaturés (n-6 < n-3) (380,381).

## 2.6 MÉCANISMES SOUS-JACENTS AUX EFFETS MODULATEURS DES LIPIDES SUR LA RÉPONSE DU SYSTÈME IMMUNITAIRE.

### 2.6.1 Rôles des éicosanoïdes

Une modification dans la production des éicosanoïdes est un des mécanismes le plus souvent proposé pour expliquer l'altération des lipides sur les fonctions des cellules immunitaires. On a attribué à plusieurs des membres appartenant à la famille des éicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique, une participation au processus inflammatoire et un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire (382-384). Les propriétés immunosuppressives et inflammatoires des métabolites éicosanoïdes dérivés de l'AA (PGE<sub>2</sub> et LTB<sub>4</sub>) sont bien connues. En fait, les propriétés suppressives des métabolites de l'AA sont supérieures à celles des dérivés de AGPI de type n-3 (191,325). Toutefois on se rappellera, à l'image du niveau d'inhibition de la prolifération des lymphocytes entre les différents types d'acides gras, que les polyinsaturés de type n-3 étaient les plus inhibiteurs. Par conséquent, les éicosanoïdes ne sont pas les seuls médiateurs responsables de l'immunosuppression engendrée par les lipides de la diète. Ainsi, certains auteurs ont suggéré que les acides gras suppriment la prolifération des lymphocytes par un mécanisme indépendant des éicosanoïdes (301,325,330). Venant appuyer cette observation, plusieurs ont montré que suite à l'addition d'inhibiteurs de la synthèse d'éicosanoïdes dans les cultures cellulaires, les acides gras conservaient leurs effets inhibiteurs malgré une légère amélioration de la prolifération (325,329,330,333). De plus, sachant que les macrophages constituent la principale source d'éicosanoïdes, les acides gras conservent leurs effets suppressifs malgré le retrait des phagocytes ou des macrophages des cultures cellulaires (325). Toutefois il faut mentionner que les effets inhibiteurs de PGE<sub>2</sub> sont dépendants de leur concentration et que l'utilisation des différentes concentrations dans les études peut expliquer la divergence des résultats. De faibles taux de PGE<sub>2</sub> (10<sup>-10</sup>) favorisent la différenciation des lymphocytes en cellules T matures, tandis que des concentrations physiologiques élevées et fortes suppriment, *in vitro*, plusieurs de leurs fonctions : la réponse mitogénique, la prolifération clonale, la stimulation antigénique, la production

d'IL-2, la production de cellules cytotoxiques et la migration lymphocytaire (45). Ainsi, un excès d'AGPI dans la diète produisant une grande quantité de PG participerait, en partie, à l'effet inhibiteur de ces diètes hyper lipidiques.

Les effets inhibiteurs des PG ont lieu principalement via la suppression de la production de l'IL-2, essentielle pour la prolifération des cellules T et B (385-387). En effet contrairement aux AGS, les AGPI entraînent une diminution de la concentration de l'IL-2 dans les cultures de lymphocytes animaux ou humains; les acides gras n-3 causant la plus grande inhibition (327,328). Ces observations impliquent que le mécanisme par lequel les AGPI suppriment la prolifération des lymphocytes se ferait via l'inhibition de la synthèse ou de la sécrétion de l'IL-2. Toutefois, la prolifération des lymphocytes n'est que partiellement rétablie suite à l'addition d'IL-2 exogène aux cultures de cellules, indiquant que ce n'est pas l'unique explication de l'inhibition de la prolifération (327).

La diminution de la production de l'IL-2 est également associée à une diminution du récepteur à l'IL-2 et de l'expression du récepteur de la transferrine, et d'une augmentation transitoire des taux d'AMPc, de même qu'une modulation des voies d'activation des PkC qui prévient l'augmentation de calcium intracellulaire (180-184,387-389). Les agents qui induisent la synthèse d'AMPc via l'activation de l'adényl cyclase dans les lymphocytes, inhibent la prolifération de ces derniers (390). Apparemment, l'action des PGE<sub>2</sub> se fait en empruntant ce mécanisme. Ces prostaglandines interagissent avec les récepteurs cellulaires de surface des lymphocytes; les lymphocytes possèdent environ 200 sites de liaison par cellule pour les PG (kd  $2 \times 10^{-9}$  M) qui exercent leurs effets via l'adényl cyclase et les nucléotides cycliques liés à la membrane. L'AMPc agit en tant que second messenger via la régulation des protéines kinases. Ainsi, les PGE<sub>2</sub> inhibent la phosphorylation protéique suite à la stimulation de la synthèse de l'AMPc. Une augmentation de l'AMPc dans les lymphocytes entraîne une inhibition de la mitogénèse, une réduction de la synthèse des lymphokines et une inhibition de la cytolysse (45).

Des changements apportés dans la production de cytokines immunosuppressives pourraient également expliquer les effets inhibiteurs occasionnés par de fortes

concentrations de prostaglandines. En effet, tout comme avec les autres facteurs qui élèvent les concentrations d'AMPc, les PG diminuent les cytokines produites par les cellules de type T<sub>H</sub>1 (interféron-gamma et interleukine-2) tandis que celles produites par les T<sub>H</sub>2 sont préservées (174,388,391,392). Une étude récente a montré que les PGE<sub>2</sub> inhibent la capacité à produire de l'IL-2 et de l'IFN $\gamma$  en agissant directement sur les cellules T naïves (174). Les résultats de cette étude suggèrent que les PG favorisent le développement d'un profil de cytokine de type T<sub>H</sub>2. Rappelons qu'à travers leur production de cytokines, les cellules T<sub>H</sub>2 suppriment l'immunité à médiation cellulaire. Ainsi, en favorisant ce profil de cytokines, les PG participent indirectement à la suppression du système immunitaire.

La majorité des informations disponibles supportent le fait que les éicosanoïdes aient une influence sur la réponse du système immunitaire et qu'ils représentent un des mécanismes par lequel les AGPI ou les lipides totaux de l'alimentation peuvent altérer la réponse immunitaire. En réalité, les évidences suggèrent que les PG doivent plutôt être considérées comme un agent de régulation et non comme un agent universel de suppression des fonctions des cellules T.

### 2.6.2 *Production de cytokines*

Les gras exercent des effets modulateurs en influençant la capacité de cellules à produire des cytokines de même que la réponse des tissus cibles à ces cytokines (383,393). Les lipides riches en AGPI n-3 ou AGMI ou encore pauvre en AGPI n-6, réduisent la sensibilité des cellules aux cytokines (393). Des études *ex vivo* menées chez des animaux montrent qu'une diète riche en AGPI de type n-3 diminuent la production de cytokines inflammatoire (IL-1, IL-6 et TNF) produites par les macrophages (349,394). Une supplémentation de la diète en huile de poisson à des volontaires sains provoque les même résultats (371-373,395). Des études *in vitro* et *ex vivo* ont montré que les AGPI de type n-3 diminuent l'expression de certaines molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales, des monocytes et des lymphocytes mis en culture (353,396-401). Ces résultats suggèrent que les AGPI n-3 affecte indirectement la capacité de liaison de

ces cellules à leurs ligands (401). Les observations *ex vivo* précédemment mentionnées indiquent que la consommation de diète contenant des AGPI de type n-3 devraient assurer une protection contre les effets néfastes d'une réponse inflammatoire secondaire à une surproduction de cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-1, IL-6) (402). Ainsi, c'est pour cette raison qu'on attribue des propriétés anti-inflammatoires à ces acides gras. De cette façon, ils agissent indirectement sur la réponse du système immunitaire. Rappelons toutefois que malgré leurs effets bénéfiques anti-inflammatoires, ils possèdent des propriétés immunosuppressives importantes.

Les gras riches en AGPI de type n-6 exercent l'effet opposé des n-3. La capacité des macrophages péritonéaux de rats à produire de l'IL-1 et de l'IL-6, en réponse au TNF- $\alpha$ , est fortement influencée par les apports en acides linoléique et en acides gras insaturés totaux de la diète. La production d'IL-1 atteint un plateau en présence de concentrations représentant de 1 à 4% de l'énergie, tandis que la production de l'IL-6 est corrélée positivement avec les apports en AGPI (403). Une quantité substantielle de travaux indique que les PGE<sub>2</sub> engendrent la production de cytokines inflammatoires (404). Compte tenu du fait que les macrophages sont la principale source de PGE<sub>2</sub> durant l'inflammation et qu'ils possèdent des récepteurs pour ces éicosanoïdes (405), les PGE<sub>2</sub> générées par les macrophages peuvent moduler la synthèse des cytokines d'une façon autocrine. Des études ont trouvé une association positive entre la production endogène de PGE<sub>2</sub> et la synthèse *in vitro* d'IL-6 (307,406,407), et des modèles expérimentaux d'inflammation chronique montrent que la production *in vivo* d'IL-6 est stimulée par les PGE<sub>2</sub> (307,408-410). Une étude récente a démontré que parmi les trois principales cytokines inflammatoires, IL-6, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ , l'IL-6 est la seule à être stimulée par les PGE<sub>2</sub> qui sont produites par les macrophages (411). Ainsi, la synthèse autocrine de PGE<sub>2</sub> affecterait différemment la production de l'IL-1 et TNF- $\alpha$  comparativement l'IL-6 (406,411,412). De plus, à l'opposé de la COX-1, la régulation de l'IL-6 est intimement reliée à l'activation de la COX-2. Cette observation suggère un mécanisme d'action possible qui stipule que l'IL-6 serait induite de façon sélective pendant l'inflammation. Ainsi, à travers la formation de PGE<sub>2</sub>, les lipides polyinsaturés de l'alimentation participent à la réponse inflammatoire et modulent la réponse du système immunitaire.

### 2.6.3 *Stress oxydatif*

Les lipides de l'alimentation représentent un des facteurs pouvant contribuer à l'augmentation des niveaux d'oxydants dans les cellules. En effet, les lipides polyinsaturés peuvent être facilement être oxydés et engendrer la production de métabolites réactifs de l'oxygène. La peroxydation des lipides est une réaction en chaîne qui se propage à travers les membranes des cellules. La production excessive de radicaux libres peut provoquer des altérations directes des molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides) mais elle peut également entraîner des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés, notamment lors de l'oxydation des lipides. Les radicaux libres ont été impliqués dans l'apoptose et dans l'étiologie de plusieurs pathologies humaines incluant l'infarctus, l'emphysème, les cataractes et le cancer (413). De plus, ils peuvent contribuer aux effets suppressifs des AGPI sur les fonctions des cellules T. Les principaux produits générés lors de la peroxydation des lipides sont : diènes conjugués, peroxydes, aldéhydes alcanes, dont la plupart sont cytotoxiques, athérogènes et mutagènes (414). Les lipides des organismes vivants sont particulièrement sensibles à l'oxydation, surtout les AGPI des membranes cellulaires. Ainsi, les événements oxydatifs peuvent avoir des effets dommageables sur les fonctions des membranes. En effet, des changements dans la composition en acides gras des lipides membranaires peuvent affecter la fluidité des membranes et le stress oxydatif des cellules. Une augmentation du degré d'insaturation des lipides membranaires entraîne une augmentation de la fluidité membranaire et des dommages oxydatifs. Des altérations dans la fluidité membranaire affectent l'expression des récepteurs, la transduction des signaux, le transport des nutriments et les interactions entre les cellules (319). Plusieurs études suggèrent qu'une augmentation du stress oxydatif soit un autre des mécanismes importants par lequel les GPI sont inhibiteurs de la réponse immunitaire (415-417). Cependant, certains prétendent que la peroxydation des lipides n'est pas responsable des effets supprimeurs des acides gras sur la prolifération des lymphocytes en raison du fait que l'ajout d'antioxydants aux cultures cellules ne prévient pas cette inhibition

(334,418). Il faut toutefois mentionner que ces études ont étudié les effets *in vitro* d'un ajout d'acides gras, de composés oxydatifs et de vitamine E à des cultures cellulaires de lymphocytes. Par conséquent, les effets *in vivo* peuvent être très différents des effets *in vitro*. Malheureusement, peu d'études se sont penchées sur les effets apportés par le type ou la quantité de lipides de l'alimentation sur le stress oxydatif. En fait, les études ont plutôt étudié les dommages causés à l'ADN. Une récente étude a montré que l'administration d'une diète hyper lipidique (21,8% vs 3,4%) augmente substantiellement les dommages oxydatifs de l'ADN chez les rats et ce, indépendamment du niveau de saturation des lipides (huile de coco vs huile de maïs) (419). Tant chez l'humain que chez l'animal, une diminution des apports en gras de la diète induit une baisse du stress oxydatif observé par les dommages causés à l'ADN (420,421). En fait, le niveau de stress oxydatif, mesuré par l'exhalation d'éthane, corrèle étroitement avec les apports totaux en lipides (421). Ces résultats suggèrent donc que l'augmentation du stress oxydatif explique, en partie, les effets néfastes d'un apport élevé en lipides. Mentionnons que les cytokines inflammatoires peuvent, elles aussi induire un stress oxydatif, amplifiant ainsi leurs effets délétères sur les cellules.

Cependant, il faut être prudent dans l'interprétation des résultats évaluant le stress oxydatif compte tenu du fait que les apports en antioxydants ne sont pas toujours contrôlés (vitamine E). La vitamine E est le principal antioxydant liposoluble des membranes biologiques. Elle protège les AGPI membranaires contre la peroxydation des lipides. Ainsi, des variations dans le contenu de vitamine E dans la diète peuvent grandement influencer la présence ou l'intensité du stress oxydatif.

#### **2.6.4 Conclusions**

Tant chez l'humain que chez l'animal, l'état nutritionnel peut engendrer des altérations de la réponse du système immunitaire. De cette façon, de nombreuses études ont décrit que le type et la quantité de lipides de l'alimentation sont impliqués dans la modulation du système immunitaire par des mécanismes qui modifient sa réponse. Plusieurs paramètres de la réponse immunitaire sont stimulés par une réduction des apports

lipidiques et inhibés par des petites quantités d'AGPI de type n-3. Étant donné que le type et la concentration de lipides de la diète ont un impact sur la réponse immunitaire, les effets globaux résultent certainement d'une interaction entre ces deux facteurs. Toutefois d'après les résultats, il semble que la quantité totale de gras dans la diète ait des effets plus prononcés sur le système immunitaire surtout, lorsque cette quantité est très élevée. Les paramètres susceptibles d'être modifier par les lipides de la diète sont : la prolifération des lymphocytes, la production de cytokines, l'activité des cellules NK et l'expression des marqueurs de surface des cellules. Les mécanismes d'action des lipides sur le système immunitaires sont encore mal compris et plusieurs sont probablement encore inconnus. Toutefois selon les connaissances actuelles, des modifications de la fluidité membranaire, la formation de produits dérivés de la peroxydation des lipides et la production des éicosanoïdes, figurent parmi la liste des mécanismes d'action responsables des effets délétères des lipides sur le système immunitaire. Compte tenu du fait qu'aucun de ces mécanismes ne semble expliquer à lui seul l'immunosuppression subséquente à une brûlure, on ne peut éliminer la possibilité d'un effet synergique de tous ces mécanismes sur la réponse du système immunitaire.



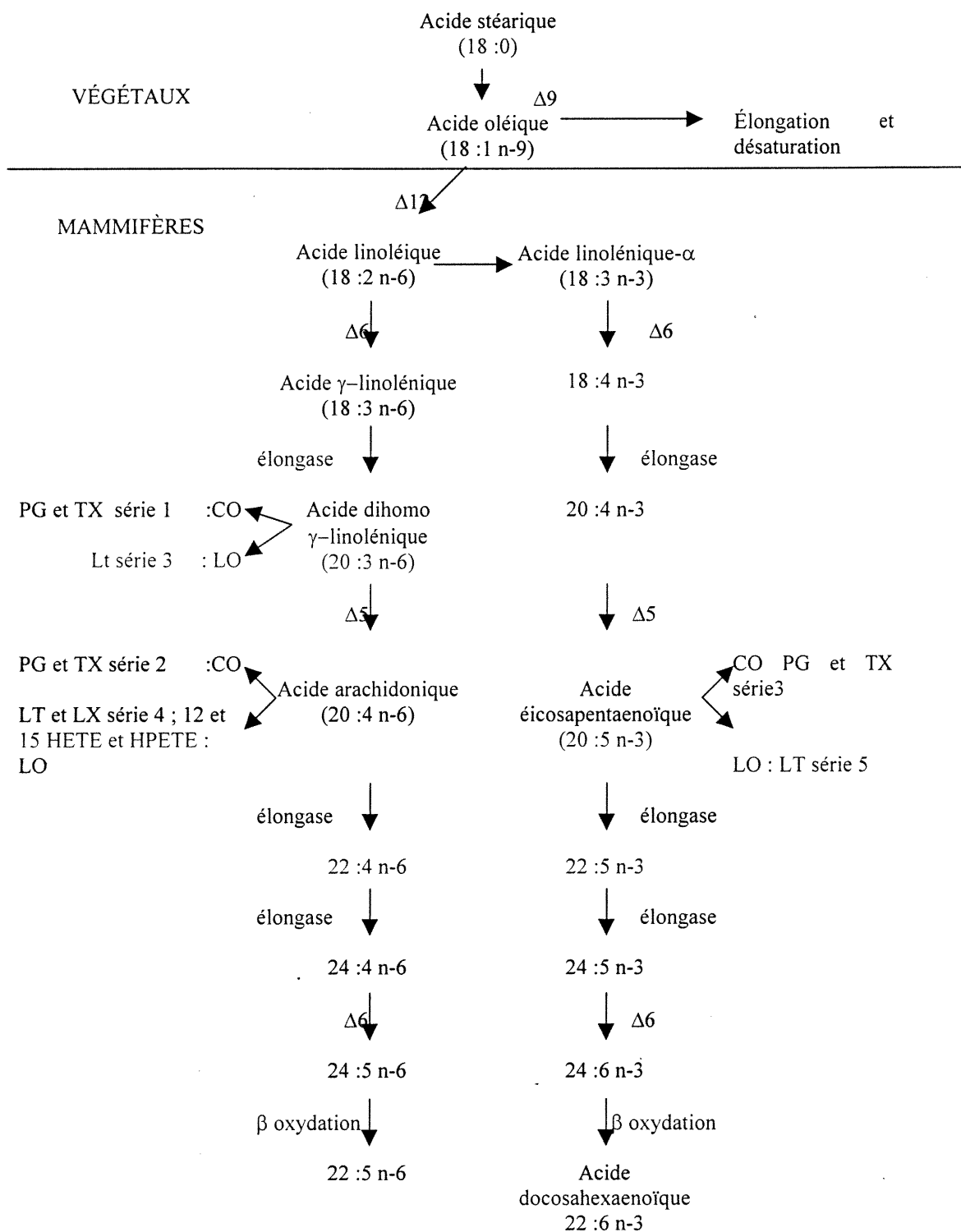


Figure 1 : Métabolisme des acides gras polyinsaturés

### 3. LIPIDES DE LA DIÈTE ET BRÛLURE

Comme nous venons de l'expliquer, les diètes riches en lipides ont des propriétés inhibitrices sur certaines fonctions du système immunitaire. Suite à une brûlure sévère, plusieurs composantes du métabolisme des lipides sont modifiées, incluant : une augmentation de la lipolyse, une augmentation de la mobilisation des lipides du tissu adipeux et des altérations dans le métabolisme des triglycérides, du cholestérol, des lipoprotéines et des prostaglandines (7,42,43,422,423). Par conséquent, compte tenu de l'importance de ces changements métaboliques et des propriétés immunosuppressives des lipides, une administration conservatrice de lipides est suggérée après une lésion thermique sévère. Étonnamment, peu d'études se sont penchées sur la quantité optimale de lipides à administrer suite à une brûlure. Quelques études menées chez l'humain et les animaux ont montré des effets bénéfiques à fournir une diète faible en lipides après une brûlure. Toutefois nous connaissons mal les mécanismes sous-jacents à ces actions favorables.

#### 3.1 ÉTUDES CHEZ L'ANIMAL

L'équipe d'Alexander fut la première à s'intéresser aux effets de la quantité totale de lipides présente dans le support nutritionnel de cobayes brûlés (424). Après avoir été infligé d'une brûlure représentant 30% de la surface corporelle, les animaux ont reçu entéralement différentes diètes qui variaient selon la quantité de lipides : 0, 5, 15, 30 et 50% des calories non protéiques sous formes de lipides. Au 14<sup>e</sup> jour post-brûlure, les animaux ont été sacrifiés et plusieurs paramètres ont été évalués. Les groupes ayant reçu moins de 15% de lipides ont montré une plus grande rétention de poids corporel et musculaire, ainsi que des valeurs de transferrine sérique plus élevées que les animaux nourris avec 30 ou 50% des calories non-protéique sous forme de lipides. Le contenu azoté des muscles et le bilan azoté cumulatif étaient maximal chez le groupe 15%. La dépense énergétique, le quotient respiratoire et la glycémie étaient semblables pour les 5 groupes. Ces résultats démontrent un meilleur état nutritionnel chez les groupes ayant

reçu 15% ou moins de lipides. Ainsi les auteurs concluent que des niveaux se situant entre 5 et 15% des calories non protéiques sous forme de lipides sont optimaux après une brûlure. Dans une étude sur les effets préventifs de l'administration d'une diète sur différents paramètres post-brûlure, la même équipe a montré une augmentation de la mortalité chez les groupes ayant reçu 40% des calories totales sous forme de lipides dans un modèle de brûlure avec infections (425). Dans un autre modèle de brûlure effectué chez les rats (426), les effets bénéfiques sur la masse musculaire de l'administration d'une faible quantité d'huile riche en acide gras à chaîne moyenne ont été renversés lorsque cette même huile fournissait 50% des calories non protéiques de la diète. Finalement, une étude plus récente a montré une amélioration du bilan azoté post-brûlure avec des diètes contenant peu ou pas de lipides (10% de l'énergie non protéique) comparativement à des diètes riches en lipides (35% énergie non protéique) (427). De plus ces différences ont également été observées entre les diètes contenant des triglycérides à chaîne longue vs des triglycérides à chaîne moyenne.

Malgré un nombre restreint d'études, les conclusions générales pouvant être tirées sont assez unanimes : l'administration d'une faible quantité de lipides dans la diète est bénéfique après une brûlure sévère. Toutefois, aucune étude ne s'est attardée aux effets de ces diètes sur les fonctions du système immunitaire et à leurs mécanismes d'action.

### 3.2 ÉTUDES CHEZ L'HUMAIN

Seulement deux études cliniques se sont intéressées au type et à la quantité de gras dans le support nutritionnel des patients brûlés. La première a comparé une solution entérale modulaire faible en gras et en acide linoléique et enrichie en acides gras oméga-3, arginine, cystéine, histidine, vitamine A, zinc et vitamine C avec deux solutions entérales commerciales, riches en lipides et dépourvues d'acides gras n-3 (244). La durée d'hospitalisation a été raccourcie et le nombre d'épisodes infectieux fut diminué chez les patients nourris avec la diète modulaire faible en gras. Ces résultats suggèrent une amélioration du statut clinique des patients brûlés avec l'administration d'une diète faible en lipides. Cependant, la diète modulaire utilisée dans cette étude comprenait de nombreuses composantes susceptibles d'avoir également des effets bénéfiques chez les patients. Il est difficile de cerner de façon spécifique le ou les éléments modulateurs de cette diète. Afin de pouvoir isoler le caractère distinct d'un faible apport en lipides auprès de patients brûlés, notre laboratoire a effectué une étude randomisée auprès 43 patients ayant été assigné à 3 groupes : contrôle (35% des calories totales sous forme de lipides), faible en gras (15%) et faible en gras avec huile de poisson (29, annexe I). Mis à part les lipides et les glucides, toutes les autres composantes des diètes étaient identiques en protéines et en micronutriments. Les patients ont reçu une des diètes expérimentales pendant les 30 jours post-brûlure. Lorsque comparés aux contrôles, les patients ayant reçu la diète faible en lipides ont présenté significativement moins d'épisodes infectieux (3/24 vs 7/13), un meilleur état nutritionnel et respiratoire et enfin, une durée de soins écourtée (1.2 vs 1.8 jours / % surface brûlée). Aucune différence n'a été trouvée entre les deux groupes faible en gras. Le bilan azoté était semblable pour les patients de chacun des groupes. Ces résultats suggèrent que l'administration d'une diète faible en lipides diminue la morbidité infectieuse et améliore la guérison des plaies des patients brûlés. De plus, une autre étude nous a permis de démontrer qu'à partir du 13<sup>e</sup> jour post-brûlure, la concentration d'interleukine-6 chez les patients ayant reçu une diète faible en lipides était significativement plus basse que celle des contrôles (37, annexe II). Ainsi, il apparaît que la concentration en lipides de la diète peut moduler l'intensité de la réponse inflammatoire après une brûlure sévère. Enfin, une dernière étude

effectuée dans notre laboratoire, nous a permis démontré que l'administration d'une diète faible en lipides (15%) enrichie en acide gras oméga-3 permettait un rétablissement plus rapide des valeurs d'IGF-1, un marqueur important de l'état nutritionnel (24, annexe III).

Tant chez l'humain que chez l'animal, les résultats concluent aux effets bénéfiques d'une faible quantité de gras du support nutritionnel après une brûlure. Cependant aucune d'entre elles ne nous renseigne sur les mécanismes d'action des effets protecteurs d'une telle diète.

#### 4. JUSTIFICATIONS DE L'ÉTUDE

Déoulant des données de la littérature précédemment mentionnées, nous pouvons dire que :

- Une brûlure sévère engendre un hyper métabolisme et un état hyper catabolique important. La présence d'une réponse inflammatoire systémique suivie d'un état d'immunosuppression généralisé est caractéristique de ce traumatisme.
- Les lipides de l'alimentation, de par leurs effets sur l'inflammation, le stress oxydatif et la formation des éicosanoïdes, participent à la modulation de la réponse du système immunitaire.
- Le support nutritionnel est maintenant reconnu comme une composante essentielle dans le traitement des patients brûlés.
- Les données cliniques et expérimentales supportent l'hypothèse selon laquelle l'administration d'une diète faible en lipides est bénéfique pour les fonctions du système immunitaire.
- Suite à une brûlure, des apports faibles en gras améliorent le statut clinique et la réponse inflammatoire des patients.
- Le rôle et les marqueurs de la réponse inflammatoire subséquents à la brûlure sont mal compris.
- Les mécanismes des effets protecteurs d'une diète faible en gras après une brûlure demeurent inconnus.

## 5. HYPOTHÈSES DE TRAVAIL

1. La concentration d'IL-2R $\alpha$  présente chez les patients brûlés est associée à l'intensité de la réponse inflammatoire systémique.
2. L'IL-2R $\alpha$  présents dans le sérum des patients brûlés n'est pas responsable de l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T.
3. La réponse inflammatoire est responsable de l'immunosuppression sous-jacente à une brûlure.
4. Les lipides de l'alimentation, via la formation de médiateurs de l'inflammation, augmentent la réponse inflammatoire et contribuent indirectement à l'immunosuppression subséquente à la brûlure.
5. Une diminution des lipides du support nutritionnel administré après une brûlure :
  - Réduira, en parallèle à l'IL-6, les concentrations d'IL-2R $\alpha$  chez l'humain
  - Réduira les paramètres de l'inflammation et du stress oxydatif chez les animaux brûlés
  - Rétablira les fonctions du système immunitaire chez l'animal

Ainsi, nous croyons que les effets bénéfiques d'une réduction de la quantité de lipides du support nutritionnel après une brûlure sont causés par :

- Une réduction de la production de médiateurs inflammatoires et immunosuppresseurs (IL-6, IL-2R $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>)
- Une réduction du taux de peroxydation des lipides et du stress oxydatif.

## 6. BUTS DES ÉTUDES

1. A. Déterminer le rôle biologique du récepteur soluble de l'interleukine-2 (IL-2Rs) chez les patients brûlés.  
B. Vérifier les effets des lipides du support nutritionnel sur ce paramètre de l'inflammation (IL-2Rs).
2. Étudier le rôle de la réponse inflammatoire engendrée par la lipopolysaccharide dans l'immunosuppression et le stress associé à la brûlure.
3. Déterminer les effets de quantité de lipides de l'alimentation sur certains paramètres du système immunitaire et du stress oxydatif.



## 7. BIOASSAYS UTILISÉS DANS CE TRAVAIL

### 7.1 PROLIFÉRATION CELLULAIRE

L'activation des cellules T est initiée lors de l'interaction d'un antigène ou d'un complexe majeur d'histocompatibilité étranger avec un récepteur cellulaire de surface spécifique. Normalement, la prolifération des lymphocytes T résulte de l'activation des récepteurs suite à leur liaison avec les complexes antigéniques exprimés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (79). L'utilisation de mitogènes permet d'imiter expérimentalement les effets des antigènes. En se liant aux récepteurs des cellules, les mitogènes induisent la blastogénèse, le premier stade d'activation correspondant à la phase G1 du cycle cellulaire à l'intérieur de laquelle a lieu la synthèse d'ARN et de protéines. La phase subséquente, la phase S, impliquant la synthèse d'ADN est apparemment initiée par l'interaction du mitogène ou de l'antigène avec les cellules accessoires qui produisent les facteurs de croissance nécessaires à la prolifération des cellules T. Dans le cadre de cette étude, les mitogènes utilisés sont : la concanavaline-A (Con-A), le H-57 et la lipopolysaccharide (LPS). La Con-A est un activateur polyclonal des lymphocytes T qui se lie aux glycoprotéines membranaires, incluant les protéines du complexe TcR-CD3 (428). Ainsi ce stimulus polyclonal implique la participation des cellules B et des macrophages à la prolifération des lymphocytes T. La LPS, quant à elle, est un activateur polyclonal des cellules B qui stimule la croissance et la différenciation de la majorité des cellules B murines (79). Le H-57 est un anticorps spécifique dirigé contre le récepteur TcR des cellules T.

Le marquage d'éléments par des radio-isotopes peut être utilisé pour identifier un précurseur métabolique, calculer l'activité de certains mécanismes biochimiques, illustrer des images par radioautographie, etc. L'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN est fréquemment utilisée comme indicateur de la prolifération cellulaire. Les substrats pour la synthèse de l'ADN sont les désoxyribonucléotide triphosphates (dATP, dGTP, dCTP et dTTP). La formation de la thymidine triphosphates (TTP) présente un mécanisme différent des trois autres nucléotides. Mentionnons tout d'abord

que deux voies peuvent mener à la formation de TTP : la synthèse *de novo* à partir de l'uridine diphosphate (UDP) ou de la cytidine diphosphate (CDP) et la voie de récupération de la thymidine qui métabolise la thymidine endogène et exogène en TTP. Ces réactions impliquent plusieurs enzymes dont la thymidylate synthétase (TS) et la thymidine kinase (TK). La thymidine synthétase est impliquée dans la synthèse *de novo* et la thymidine kinase dans la voie de récupération de la thymidine. La thymidine kinase est reliée de près avec l'état de prolifération de la cellule. Pendant la phase S (réplication de l'ADN) du cycle de prolifération de la cellule, l'activité de la TK est considérablement augmentée. Pour des raisons inconnues, la TK entre efficacement en compétition avec la TS, ce qui signifie que la synthèse *de novo* de la TTP diminue lors de la phase S du cycle cellulaire, favorisant ainsi l'incorporation de la thymidine par la voie de récupération. Par conséquent, la thymidine exogène sera utilisée préférentiellement par les cellules en phase S. Ceci explique l'utilisation de la [<sup>3</sup>H] thymidine pour estimer le taux de la synthèse d'ADN.

De façon générale, les radio-isotopes émettent des radiations ionisantes qui peuvent être de trois types : les rayons  $\beta$ ,  $\alpha$  et  $\gamma$ . Le tritium émet des rayons  $\beta$  que l'on détecte à l'aide d'un liquide de scintillation. Ce liquide est constitué de composés organiques fluorescents (fluors). Les particules  $\beta$  émises par les échantillons marqués ont une grande probabilité d'entrer en collision avec une molécule de solvant, qui devient excitée en faisant passer un électron à un orbital de niveau supérieur. En revenant à son état primaire, l'électron émet un photon de lumière. Le photon est absorbé par le fluor qui devient excité à son tour émettant ainsi une lumière de plus faible énergie mais de plus grande longueur d'onde qui est mesurée par le compteur  $\beta$ .

## 7.2 THIOLS INTRACELLULAIRES

Les thiols de faibles poids moléculaires, le glutathion et les protéines sulfhydryls réactives (plusieurs protéines exposants des groupes cystéines), sont les principaux participants du système cellulaire d'antioxydants. Le glutathion est abondant (3 à 10 mM) dans le cytoplasme, le noyau et la mitochondrie et il constitue le principal antioxydant soluble dans ces composantes de la cellule (429). Les protéines sulfhydryls réactives se retrouvent autant dans les protéines solubles que dans celles liées aux membranes. La concentration du glutathion cellulaire possède des effets importants sur sa fonction antioxydante et, en présence d'une carence en nutriment, d'exercice ou de stress oxydatif, elle fluctue considérablement. Pour mesurer les thiols totaux intracellulaires, nous avons utilisé une sonde intracellulaire, le 5-chlorométhylfluorescein diacétate (CMFDA). Après que la sonde perméable à la membrane soit entrée dans la cellule, une hydrolyse effectuée par des estérases converti le CMFDA non-fluorescent en 5-chlorométhylfluorescein fluorescent. Ce dernier réagit avec les thiols présents sur les protéines et les peptides pour former des conjugués aldéhydes stables. Les signaux lumineux émis par ces conjugués aldéhydes sont détectés par cytofluorométrie.

### 7.3 POTENTIEL MITOCHONDRIAL DES SPLÉNOCYTES

Les mitochondries représentent la source d'énergie de la cellule parce qu'elles produisent la plus grande partie de son ATP. La densité des mitochondries reflète les besoins énergétiques de la cellule considérée, en l'occurrence les splénocytes, et, ces organites sont habituellement plus nombreux là où l'activité est la plus intense. Afin d'évaluer la capacité de production d'énergie ou le potentiel membranaire mitochondrial des cellules de la rate de nos animaux, nous avons utilisé une sonde spécifique, la Rhodamine 123. Cette sonde est formée de cations lipophiliques qui s'accumulent dans la mitochondrie en proportion du  $\Delta\Psi$  (différence de potentiel mitochondrial entre la membrane extérieure et intérieure de la mitochondrie). La rhodamine 123 se concentre spécifiquement dans les mitochondries en raison du potentiel transmembranaire que ces organelles maintiennent dans les cellules vivantes. Ainsi, la Rhodamine 123 est une sonde spécifique utilisée pour mesurer l'abondance et l'activité des mitochondries. La Rhodamine est rapidement séquestrée par les mitochondries actives et l'équilibre de la sonde est atteint après environ 30 minutes d'incubation avec les cellules. La Rhodamine retenue dans les mitochondries actives émet des faisceaux fluorescents qui sont captés par un appareil à cytofluorométrie.

#### 7.4 MALONALDEHYDE (MDA) HÉPATIQUE

La peroxydation des lipides est un mécanisme bien établi des atteintes cellulaires et, est utilisée comme indicateur du stress oxydatif présent dans les cellules et tissus. Les peroxydes formés par les lipides sont instables et se décomposent pour former une série de composés complexes incluant des composés réactifs carbonyles. Les peroxydes formés par les AGPI génèrent, après décomposition, le malonaldehyde (MDA) et le 4-hydroxyalkenals. La mesure du MDA et du 4-hydroxyalkenals sont utilisés comme des marqueurs de la peroxydation des lipides. Le test colorimétrique utilisé dans cette étude est basé sur la réaction, à 45°C, d'un réactif chromo génique, le N-méthyl-2-phenylindole, avec les MDA. À cette température, une molécule de MDA réagit avec 2 molécules du réactif pour produire un chromophore stable qui possède une absorbance maximale à 586 nm.

**III. ARTICLE 1**

**INCREASED SERUM SOLUBLE-INTERLEUKIN-2 RECEPTOR IN BURN PATIENTS: CHARACTERIZATION AND EFFECTS ON THE IMMUNE SYSTEM.**

**Nathalie Jobin<sup>1</sup>, Dominique Garrel<sup>1</sup>, Jacques Bernier<sup>1,2\*</sup>.**

From 1: Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Centre des Grands Brûlés, Montréal, PQ, Canada. 2: INRS-Institut Armand Frappier, Centre de recherche en santé humaine, Pointe-Claire, PQ, Canada.

Supported by Fonds de La Recherche en Santé du Québec pour les Grands Brûlés.

**Keywords : Soluble Interleukin-2 receptors, Interleukin-2, Burn, Interleukin-6, Inflammation.**

**Short Title: SOLUBLE-INTERLEUKIN-2 RECEPTOR IN BURN PATIENTS**

**Référence:** Human Immunology Mar; 61(3): 233-46, 2000.

## ABSTRACT

The consequences of high serum concentrations of the interleukin-2 receptor's  $\alpha$  chain, sIL-2R $\alpha$ , in several diseases, are poorly understood. The objective of this study is to determine the form of sIL-2R $\alpha$  in burn patients and its biological role. sIL-2R $\alpha$  was measured in 18 severely burn individuals who received nutritional support with normal or low fat content. sIL-2R $\alpha$  was elevated throughout the study and it was notably lower in patients fed a low fat diet. Sera IL-6 and sIL-2R $\alpha$  were significantly correlated ( $r = 0.74$ ,  $p < 0.05$ ) in burn patients. The presence of sIL-2R $\alpha$  was associated with a decrease of DR molecules in the CD2<sup>-</sup> and CD11b<sup>+</sup> cells of these patients. Western blotting of serum protein with N-terminal or C-terminal specific antibodies indicating that sIL-2R $\alpha$  represents the extracellular domain of this molecule. Patient's sera inhibited specifically murine, but not human IL-2 dependant T cell proliferation. To determine the significance of sIL-2R $\alpha$ , recombinant sIL-2R $\alpha$  was used in different cellular model involving IL-2. sIL-2R $\alpha$  inhibited NK cell activity by 50% in the presence of IL-2. The basal proliferation of PBMC was inhibited by sIL2R $\alpha$ , but PHA induced proliferation was unaffected by this form of receptor. INF- $\gamma$ 's production induced by OKT-3 on PBMC was not altered by sIL-2R $\alpha$ , but IL-2 induced increase in INF- $\gamma$  production was suppressed. The decreasing production of INF- $\gamma$  in presence of IL-4 was significantly increased in presence of sIL-2R $\alpha$  in media. These results show that a large amount of sIL2-R $\alpha$  circulating in burn patients are related to the inflammatory response. The amount of dietary fat modulates sIL2R $\alpha$  concentrations in burn patients, confirming the beneficial effect of low fat administration after burn trauma. Inhibition of T cell activation in burn patients is not related directly to sIL-2R $\alpha$ , although the presence of sIL-2R $\alpha$  in serum can inhibit some IL-2 mediated response, such as the emergence of TH1 and TH2 cells.

**Keywords :** Soluble Interleukin-2 receptors, Interleukin-2, Burn, Interleukin-6, Inflammation, TH1, TH2, Natural Killer.



**Abbreviations.**

DiO : 3,3'-diotadecyloxacarbocyanin  
FITC : fluorescein isothiocyanate  
HBSS : Hank's balanced salt solution  
IL-1 : interleukin-1  
IL-2 : interleukin-2  
IL-2R : interleukin-2 receptor  
IL-4 : interleukin-4  
IL-6R : interleukin-6 receptor  
INF : interferon  
kDa : kilo Dalton  
LF : Low Fat  
M : Molar  
mAb : monoclonal antibodies  
MHC : major histocompatibility complex  
NK : natural killer  
PBMC : Peripheral blood mononuclear cells  
PBS : Phosphate buffer  
PHA : phytohemagglutinin  
PGE2: prostaglandin E2  
rIL-2 : recombinant interleukin-2  
rIL-6 : recombinant interleukin-6  
R-PE : R-phycoerythrin  
sIL-2R $\alpha$ : soluble interleukin-2 receptor alpha  
TBSA : total body surface area  
TH : T helper lymphocytes  
TNF : tumor necrosis factor  
 $\mu$ Ci : micro Curi

## INTRODUCTION

Interleukin-2 (IL-2) is a major multipotential cytokine involved in the mediation of a wide range of immunologic functions like growth factor for T lymphocytes and natural killer (NK) cells (1). The action of IL-2 on cells is mediated by its binding to the IL-2 receptor proteins (1). IL-2 bind on T cells with three distinct cell surface proteins: 1) the  $\alpha$  chain, IL-2R $\alpha$  (Tac), which is a 55 kDa polypeptide (p55) that binds IL-2 with Kd  $10^{-8}$  M; 2) the larger 75 kDa subunit (IL-2R $\beta$ ) has an intermediate binding affinity of approximately  $10^{-9}$  M; and 3) the 64 kDa  $\gamma$  subunit (IL-2R $\gamma$ ) (1-5). The complex formed by the last two subunits, called IL-2R $\beta\gamma$ , represent the receptor of intermediate affinity (Kd of approximately  $10^{-9}$ M) and mediates signal transduction (5-7). Cells that express IL-2R $\alpha$  as well as IL-2R $\beta\gamma$  represent the high affinity receptor for IL-2 (Kd of approximately  $10^{-11}$ M) (1-7). Binding of IL-2 to cells expressing only IL-2R $\alpha$  does not lead to any detectable biologic response (6,7), therefore the function of the IL-2R $\alpha$  chain is to increase the specificity and affinity of the receptor for the IL-2 (8-10). Utilization of IL-2R $\beta\gamma$  as a signaling module is also shared by another cytokine, the IL-15 (11).

The IL-2R $\alpha$  chain, like other interleukin receptor, exists in a circulating form (12,13). The soluble form of IL-2R $\alpha$  (sIL-2R $\alpha$ ) produced after T cells stimulation is the extracellular component of the transmembrane Tac antigen and has the same affinity as the native protein (15-17). Liberation of sIL-2R $\alpha$  after T cell activation is associated with the rapid turnover of IL-2R $\alpha$  and depends upon continuous de novo synthesis during an immune response (18). Two possible mechanisms of release of soluble sIL-2R $\alpha$  have been suggested: sIL-2R $\alpha$  could be synthesized as a secretory form of transmembrane-domain-deficient-receptor arising from an alternate splicing of the full-length mRNA, producing a truncated mRNA, or, sIL-2R $\alpha$  could be formed by the proteolytic cleavage of the extracellular domain of the cell-surface-associated IL-2R $\alpha$  (19-21). Shedding of IL-2R $\alpha$  involves a metalloprotease as demonstrated in COS-cells transfected with a cDNA coding for the membrane bound protein (22). The liberation of sIL-2R $\alpha$  is generally a phenomenon associated with the immune system activation.

Recently, *in vivo* data suggests that tumor tissue may be responsible for elevated amounts of serum sIL-2R $\alpha$  in cancer patients (23-27). Indeed, elevated serum sIL-2R $\alpha$  levels have been observed in several clinical conditions. These conditions included adult T-cell leukemia (17, 28), autoimmune diseases (29), transplant rejection episodes (30), acquired immunodeficiency syndrome (31,32), multiple sclerosis (33, 34), neoplastic and inflammatory diseases (35-38). High levels of sIL-2R $\alpha$  and neopterin, specific markers of macrophage functions, are associated with negative prognosis in AIDS patients, burn patients and in Gram-negative sepsis patients (31, 39-41). The presence of sIL-2R $\alpha$  in serum of patients with tumors or autoimmune diseases are generally associated to T cells activation (42,44). On the other hand, several reports have demonstrated that B cells and macrophages can be the sources of sIL-2R $\alpha$  (1,12,15,45). Moreover, non-immune cells such as the pituitary cells, express IL-2R $\alpha$  and can contribute to the soluble form of these receptors (46-49).

The role of soluble sIL-2R $\alpha$  in those diseases is unknown. Based on its capacity to bind on IL-2-coupled affinity supports, this soluble form of the receptor has been postulated to play an immuno-regulatory role by interfering with the free IL-2 concentration and prevent the interaction with membrane IL-2R (10,50). Soluble receptors can also be implicated in the transport of IL-2 to prolong the half-life of the bound ligand or increase the affinity for membrane receptors as shown for other cytokine receptors such as IL-6R (51). Studies have demonstrated that sIL-2R $\alpha$  from patients with rheumatoid arthritis, hairy cell leukemia or ovarian cancer cannot overcome the proliferation of mitogen-stimulated cells although direct binding of IL-2 to sIL-2R $\alpha$  was demonstrated (35,52,53). However in other models it was shown that sIL-2R $\alpha$  exerts inhibitory activity blocking cell proliferation (50,54). The origin of the sIL-2R $\alpha$  could explain the disparity of the results reported.

The molecular form of IL-2R circulating in the serum can be divergent from each pathology. In rheumatoid arthritis patient, sIL-2R $\alpha$  correspond to a high molecular weight (greater than 90 kDa) compared to low molecular weight detected in serum of

patients with rheumatoid disease (37,44). Severe burn injury caused a highly elevated level of IL-2R $\alpha$  (39,40). This increase of the soluble form of IL-2R $\alpha$  was associated with the immunosuppression following this trauma (55). In this pathology, it was suggested that the rise of sIL-2R $\alpha$  concentrations result from T cells activation due to the excessive release of autoantigens in the circulating blood and a need for down regulation of IL-2-dependant immune response. In this view and considering the low-affinity of IL-2 for IL-2R $\alpha$  this possibility remains to be determined. However, no characterization of the molecular form of these receptors was made and no relation between their presence and inflammatory syndrom was determined. Previously, we have demonstrated that a low fat diet administered after burn trauma induce a decrease of circulating IL-6 and the number of infections (56,57). Beneficial effects of monitoring the diet in burn patients was not considered in function of other immune parameters.

To further evaluate the significance of sIL-2R $\alpha$  in the serum of burn patients, we have determined the relation between their presence and the level of IL-6. The molecular form of this receptor in the serum of burn patients was studied and their biological significance. Several immune parameters using a highly purified form of the receptors expressed in the insect's cell system were also determined. Purified sIL-2R $\alpha$  gave us the opportunity to assess the role of IL-2R $\alpha$  without the interfering effects of other peptides which can be associated with sIL-2R $\alpha$  in vivo and can mediate the immunomodulation. The results obtained show that sIL-2R $\alpha$  present in the serum of these patients were formed by the extracellular part of the receptor, that binds the human IL-2. Their expression was associated with a decrease of MHC class-II molecule on the cell's surface. We also found a positive correlation between the inflammatory cytokine, IL-6, and the amount of IL-2R $\alpha$ . Finally, the decrease of fat in nutritional support after thermal injury decrease the level of IL-2R $\alpha$  and associated IL-6 production. We report here that the purified form of sIL-2R $\alpha$  can overcome the biological effects of IL-2 on NK activity. However, sIL-2R $\alpha$  cannot perturb the T cells mitogenic response, but can induce a dissociated production of IL-2 and INF- $\gamma$ . The role of sIL-2R $\alpha$  and biological significance was discussed.

## MATERIAL AND METHODS

### Materials.

RPMI 1640 (Bio Media Canada inc, Drummondville, Can) was supplemented with a penicillin (50 I.U.)- streptomycin (50 µg/ml) solution and 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS, Medicorp Inc, Montreal, QC, Can). 3,3'-diiodoacetylcarboxyanin perchlorate (DiO), propidium iodide (PI), Tween-20, NP-40, gelatin, EDTA, leupeptin, pepstatin A, PMSF and phytohemagglutinin-P (PHA) were obtained from Sigma-Aldrich Canada LTD (Oakville, ON. Can). Recombinant human or mouse interleukin-2 (rIL-2) and interleukin-6 (rIL-6) were purchased from Boehringer Mannheim (Laval, QC, Can). Alamar Blue, the Cytoscreen Human IL-2R $\alpha$  enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA), the intracellular staining kit for human IL-4, anti-INF- $\gamma$  and anti-IL-2 monoclonal antibody (mAb) fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate were obtained from Biosource international (Camarillo, CA). Biotynalated anti-CD4, anti-HLA-DR R-phycoerythrin (R-PE) tagged and antibodies anti-CD2, anti-CD11b, anti-CD8 all conjugated to FITC were purchased from Becton Dickinson Canada Inc. (Mississauga, Ont. Can). Avidin quantum-red tagged, phosphate buffer (PBS) and Hank's balanced salt solution (HBSS) were obtained from Gibco-BRL (Burlington, ON, Canada). ECL chemiluminescence system, protein A/G Sepharose beads and Ficoll-Hypaque were purchased from Amersham Pharmacia biotech (Baie d'Urfé, QC, Can). Rabbit polyclonal antibody anti-IL-2R $\alpha$  (C-20) or anti-IL-2R $\alpha$  (N-19) and anti-mouse IgG- peroxidase conjugated were obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). Mouse mAb anti-IL-2R $\alpha$  (7G7B6) was obtained from Upstate biotechnology (Lake Placid, N.Y). Mouse mAb anti-CD3 (OKT-3) were produced in our lab and purified on protein A/G sepharose. Recombinant IL-2R $\alpha$  extracellular domain were obtained from Dr Tom Ciardelli from the Dartmouth Medical School, Hanover. This form of sIL-2R $\alpha$  was expressed in insect cells and purified (58). Proteins were keep at low pH at 4°C before being used using in our experiment. [<sup>3</sup>H]-thymidine in saline solution (20-40 Ci/mmol) was purchased from ICN Pharmaceuticals Inc (Costa Mesa, CA).

## **Patients, samples and cell lines.**

***Patient care, and nutritional support:*** In this study, 18 men and women between 18 and 65 years old with thermal burn injury greater than 20% of total body surface area (TBSA) and with no other known medical condition were recruited. All patients were admitted to the burn center within 24 hours post-injury. The Parkland formula with Lactate-Ringer solution was used for resuscitation. With the exception of the hands, burn wounds were left without dressing and without antiseptic ointment. The existence of bronchial injury was assessed by bronchoscopy, which was performed in all patients within 3 days post admission. Pain was managed using IV morphine. Patient's characteristics are describes in Table 1. Nutritional support was started 24 hours post admission through a naso-enteral tube inserted under gastroscopic guidance. The goal for energy intake was calculated using the Curreri formula and adjusted with bi-weekly measurements of resting energy expenditure as previously described (57). Patients were randomly assigned to three groups, using a random number table. This randomization was prospective and the investigator responsible for the patient's inclusion was not aware in advance to which group the patient would be assigned. Patients were assigned to one of three enteral solutions, as follows: Group 1 (control) fat 35% of total calories, carbohydrates 40%, protein 25%; group 2 Low fat diet (LF): fat 15%, carbohydrates 60%, protein 25%; group 3 low fat diet with 50% lipid as omega 3. The complete composition of these solutions is described in Garrel et al. (57). All nutrients other than fat and carbohydrates were identical in the 3 solutions. The proportion of energy received enterally and parenterally was not different in the 3 groups. This experimental feeding lasted 28 days. All patients received vitamin A (50 000 UI/week), zinc (10 mg/day) and vitamin C (500 mg/day) as supplements. The protocol for this study was approved by the Ethics Committee of our hospital and written consent was obtained from the patient or their closest relative.

***Samples:*** Blood was sampled every 3 days at 7 AM from day 1 through day 28. Day 1 being the day following admission. Blood samples were centrifuged without delay and plasma sample was aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Clinical information was taken daily from the medical file of the patient.

**Cell lines:** PBMC from patients or healthy donors were separated from heparinized blood samples by centrifugation on Ficoll-Hypaque density gradient. Collected cells were washed three times in a saline solution and adjusted at desired concentration in complete RPMI. **Cell lines:** Two IL-2-dependant cells lines were used, murine HT-2 cells (obtained from Dr patrice Hugo, Clinical Reschear Institut, Cananda) and human W1710 cells (obtained from Dr Michel Tremblay, Laval University, Canada). Interleukin-6 dependant cells, 7TD1, and a human erythroleukemic cell line, K562, were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MA).

### **Natural Killer (NK) cells assay**

Assessment of NK cell activity was performed by flow cytometric assay (59). K562 cells were stained with 3 mM of lipophilic dye, DiO at 37 °C for 15 minutes. Labelled cells were extensively washed in PBS and keep in the dark before utilization. PBMC and DiO labelled K562 cells were pooled in 96 wells plate at a ratio of 1 :10, 1 :20, 1:40 and 1 :80. Plates were centrifugated at 500 rpm for 30 sec and incubated at 37°C for 2 hours. NK activity was determined by flow cytometry analysis with a FACScan appartus (Becton Dickinson). At first, a live gate on DiO stained K562 cells was performed using the fluorescence in the FL-1 detector to exclude the PBMC during the acquisition of data. NK activity was determined by measuring the mortality in K562 cell populations using PI staining in FL-3. Results were presented in term of NK activity in comparaisn to the mortality in samples incubated without PBMC.

### **Mitogenic response of normal PBMC**

Mitogenic response was measured by standard procedure. Briefly, each well of flat-bottom plates received 200 µl of cells suspension ( $2 \times 10^6$  cells/ml). Mitogenic lectine, PHA was added at a final concentration of 2 µg/ml. Plates were incubated for 48 hours at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> water-saturated atmosphere. Six hours before the end of the

incubation time, 0.5  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]-thymidine were added in each well. Cells were harvested on glass filters and the thymidine incorporation determined with a  $\beta$  counter.

### **Measurements of interleukin-6 and soluble interleukin-2 receptor.**

***Interleukin-6*** : Interleukin-6 was measured with a bioassay, using IL-6 dependent 7TD1 cells as previously describe (56). Shortly, 7TD1 cells were washed 3 times in complete RPMI and starved 1 hour at 37°C. Cell concentration was adjusted to  $2 \times 10^4$  cells/ml and 100  $\mu\text{l}$  was added to each well of a 96-well microtiter plate. Serial dilutions of sera were made and 100 $\mu\text{l}$  was added per well. Serum was tested in triplicate for each dilution. Recombinant IL-6 was used to establish the standard curves. The background response was determined in the absence of IL-6. Cells were incubated for 18 hours at 37°C and the proliferation was determined by the addition of 20% Alamar blue. Dye reduction was determined using absorbance by spectrophotometry set at 550 nm (reduced form) with a reference at 620 nm (oxidized form). Data was displayed in U/ml as compared with rIL-6 standard. The lower limit of sensitivity of IL-6 assay was 1.5 U/ml.

***Soluble interleukin-2 receptor*** : Soluble interleukin-2 receptor was measured by ELISA with a commercial kit. The assay was performed according to the manufacturer's instructions. Serum IL-2R concentrations were expressed in pg/ml and the lower detection limit of the assay was 16 pg/ml.

### **Western blotting of IL-2R $\alpha$ forms.**

Pooled burn patient plasma was diluted 1:2 in dilution buffer [50 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA and the protease inhibitors leupeptin (3 mM), pepstatin A (2 mM) and PMSF (1 mM)]. Serum was precleared twice for 30 min with protein A/G-Sepharose beads coated with normal rabbit serum. Ten  $\mu\text{l}$  of rabbit polyclonal anti-IL-2R $\alpha$  (C-20 or N-19) was added to the diluted serum and incubated for 2 h prior to the collection of the immune complexes by the addition of protein A/G-Sepharose beads for 30 min. The



supernatant was removed and the beads were washed 6 times in dilution buffer supplemented with 1% of NP-40. Laemmli loading buffer (2x) was added, and samples were boiled for 5 min. Proteins were resolved on 10% SDS-PAGE gel (60) and subsequently transferred on nitrocellulose membranes by electroblotting. Membranes were blocked for 1 hr in Tris-buffered solution supplemented with 0.1% Tween-20 (TBS-T) containing 2% gelatin. Membranes were incubated in the same buffer with mouse mAb anti-IL-2R $\alpha$  (7G7B6) at a final concentration of 1  $\mu$ g/ml. After washing, the nitrocellulose filter was incubated with an anti-mouse IgG peroxidase tagged for 1 hour before the positive reaction was revealed with ECL system.

### **Measure of the proliferation of IL-2 dependent cell line**

Interleukin-2 dependent T cell line (mouse HT-2 cells or human W1710 cells) were used. Cells were washed 3 times with HBSS and then incubated at 37°C for 1 hour without any nutritive factor. Following this starvation cells were aliquoted into 96 micro-well plate at a concentration of  $5 \times 10^5$  cells/well with 10% of control or burn patient plasma. In addition, mouse or human recombinant IL-2 was added at concentrations of 5 U/ml or 50 U/ml respectively. The plates were incubated for 24 hours at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> water-saturated atmosphere. The proliferation was determined by an addition of 20% Alamar blue. As previously described, the reduction of Alamar blue was then determined 18 hours later. Data was analyzed as ratio of inhibition response: O.D. obtained with 50 U/ml IL-2 / O.D. obtained with 5 U/ml IL-2. In conditions used in this paper, we found that value of ratio after 24 hr incubation was around of 1.

### **Flow cytometric analysis.**

**Immunophenotyping** : Cells were analysed by two-color flow cytometry. PBMC were incubated for 30 minutes on ice in presence of fluorochromes conjugated mAbs for CD2, CD11b, HLA-DR, CD4 and CD8 or isotypic control. Cells were washed in PBS and analysed with a FACScan flow cytometer using Lysis software.

***Intracellular staining of cytokine production*** : Cells ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were stimulated in 24 wells plate previously coated with  $1 \mu\text{g/ml}$  of OKT-3 mAb for 18 hours at  $37^\circ\text{C}$  in  $5\% \text{CO}_2$  with or without interleukin. At the end of the incubation time,  $1 \mu\text{l}$  of IC Block solution was added and cells were incubated for an additional 4 hours before harvesting. Intracellular staining of IL-4 and INF- $\gamma$  or IL-2 production in  $\text{CD4}^+$  lymphocytes was performed by triple labelling methods using ICScreen kit. Briefly, unstimulated and stimulated cells were collected and washed in PBS. Cells ( $1 \times 10^6$  cells) were incubated with biotynalated-CD4 mAb ( $1\mu\text{g}$ ) at  $4^\circ\text{C}$  for 30 minutes and then washed. Streptavidine-Quatum Red were added and cells were incubated on ice for 30 min and washed twice in PBS. Thereafter, cells were fixed with 1 ml of paraformaldehyde solution (IC Fix) for 10 min at  $4^\circ\text{C}$  and washed twice in PBS. Fixed cells were incubated 5 min at room temperature in presence of 1 ml permeabilixing agent (IC Perm). Anti-IL-4-PE and INF- $\gamma$ -FITC or IL-2-FITC diluted in IC Perm were added to cells and incubated for 30 minutes at  $4^\circ\text{C}$  with gentle agitation. Cells were washed twice with 1 ml of IC perm and flow analysis was performed. Presence of IL-4 and INF- $\gamma$  or IL-2 were done in  $\text{CD4}^+$  gated cells. Antibody isotypic control for each cytochromes used and permeabilization control were performed.

### **Statistical analysis.**

The statistical relevance was evaluated with an ANOVA test. Differences are considered as significant for  $P < 0.05$  and very significant for  $P < 0.01$ . All experiments were performed three times and representative results were presented.

## **RESULTS**

### **1. Presence of the truncated form of IL-2R $\alpha$ in sera from burn patients.**

Burn injury causes an increase of inflammatory cytokines and their receptors. Different labs have reported the presence of sIL-2R $\alpha$  after this trauma (39,40,55,61). However, the nature of this receptor remains elusive. With this experiment we wanted to evaluate the nature of the soluble interleukin-2 receptor present in the plasma of burn patients.

We have attempted to immunoprecipitate sIL-2R $\alpha$  with an antibody directed against the intracellular C-terminal portion (lanes 1,2,3) or the extracellular N-terminal portion (lanes 4,5,6) of this receptor. Western blot done with a antibody specific to whole IL-2R $\alpha$  revealed (Figure 1) that neither in normal (lane 1) nor in the burn sera (lane 2,3) was there a trace of the IL-2R when using the antibody specific to the C-terminal portion. In contrast, immunoprecipitation with an antibody raised against the N-terminal portion of this receptor revealed the presence of a 43kDa molecule present in the sera of the burn patients (lane 5 and 6). Traces were also found in normal sera (lane 4). These results show that the sIL-2R $\alpha$  form present in burn patient does not contain the cytoplasmic domain and molecular weight suggests that extracellular portion of the receptor is the soluble form.

## **2. Serum from burn patient inhibits IL-2 dependent T cells proliferation.**

Serum from burn patients inhibits T cell activation (55,62 ). To determine if the inhibition can be related to the presence of soluble IL-2R, we cultured a mouse IL-2 dependent T cell line in presence of 10 % heat inactivated sera obtained from burn patient up to 21 days after injury (Figure.2). Cells were incubated in the presence of either a low or a high concentration of recombinant human IL-2 to evaluate the specificity and the magnitude of the inhibition. The results were transformed into an inhibitory ratio corresponding to the proliferation at each IL-2 concentration (response in presence of high concentration/response in presence of low concentration). Unrelated sIL-2R $\alpha$  inhibition gave the same decreasing response in presence of low or high amounts of IL-2. As expected, high concentrations of sIL-2R $\alpha$  in the patient's serum corresponded to an increase in the inhibition of T cell proliferation. In sera used for this experiment the maximum concentrations of sIL-2R $\alpha$  noticed between days 16 to 22. The maximum level of sIL-2R $\alpha$  was at day 19 where we evaluated the mean concentration in sera tested at 4.7 ng/ml. Incubation of these cells under the same conditions, but using recombinant murine IL-2, failed to reproduce the inhibitory effect of sera, verifying the specificity of this assay. In a different experiment using a human IL-2-dependent T cells line, we were unable to inhibit cell proliferation (data not

shown). Indeed, using either low or high concentrations of recombinant human IL-2, inhibited the cell proliferation, demonstrating that another factor may be responsible for T cells impairment. This finding shows that the presence of sIL-2R $\alpha$  in burn serum can inhibit IL-2 dependent proliferation in mice's cell system.

### **3. Expression of sIL-2R $\alpha$ in burn patients was associated with a decrease of class II MHC molecule expression.**

Burn injury is associated with a change in blood cell populations (62 ). A dramatic depletion of T cells was noted following burn. We observed  $9.63 \pm 3.23$  % of T cells in patients with burn injury as compared to  $61.50 \pm 3.63$  in normal subjects (n=10). Following the burn injury, no changes in the number of, CD11b<sup>+</sup> or in gated lymphocytes for CD2<sup>-</sup>,CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells expressing the class II MHC molecule were noted (Figure 3A). However, the level of DR molecules, as evaluated by mean fluorescence, was significantly lower in CD2<sup>-</sup> lymphocytes and CD11b<sup>+</sup> cells (Figure 3B). Moreover, we found that the burn patients with lower amounts of sIL-2R $\alpha$  did not differ significantly in the expression of class II MHC molecules (data not shown). These results suggest a link between the expression of DR molecules and the presence of sIL-2R $\alpha$ .

### **4. Low fat diet decreases seric concentration in burn patients of sIL-2R $\alpha$ and inflammatory cytokines.**

We have previously demonstrated a decrease of the inflammatory cytokine, interleukin-6 (IL-6) when burn patients received a low fat diet (56). In this study, we wanted to evaluate the association between an increasing level of sIL-2R $\alpha$  and the inflammatory response using the IL-6 concentration as an indicator (Figure 4A). We observed that burn patients have higher values of IL-6 (mean values : 2365 U/ml) compared to the normal concentration in healthy donors (16 U/ml). Patients fed with a high fat diet had significantly higher concentrations of IL-6 than patients on a diet containing a low amount of fat composed of either n-6 or n-3 lipids (mean values : 1190 vs 3540 U/ml

respectively). sIL-2 $\alpha$  concentration in the same cohort of patients are shown in figure 4B. The average concentration of sIL-2R $\alpha$  in burn patients is elevated throughout the study (mean 2922 pg/ml) as compared to the concentrations observed in normal subjects (124 pg/ml). There is a significant difference in the concentration of sIL-2R $\alpha$  between the low fat group and the high fat group throughout the study: control patients had significantly higher concentrations of sIL-2R $\alpha$  than patients who received a low fat diet (mean values : 4187 vs 1657 pg/ml respectively). Moreover there is a significant and positive correlation between sIL-2R $\alpha$  and IL-6 levels in our burn patients ( $r = 0.7393$ ,  $p < 0.05$ ). These results illustrate that low fat diets during burn care decreases the inflammatory response. A decrease in IL-6 concentrations was correlated with a low amount of sIL-2R $\alpha$  which suggests a link between this molecule and the immunosuppression following burn injury.

##### **5. Effects of soluble recombinant sIL-2R $\alpha$ on the activity of NK cells.**

In an effort to understand the significance and the role of sIL-2R $\alpha$  in a pathologic situation, we have attempted to determine the effects of recombinant sIL-2R $\alpha$  on different immune parameters involving IL-2. It is well established that the incubation of PBMC with recombinant human IL-2 augments NK activity against the chronic myelogenous leukemia cell line K562 (63-65). PBMC were incubated in presence of increasing amounts of IL-2 with or without sIL-2R $\alpha$  for 18 hours before determining NK activity. A dose dependent increase of NK activity was observed in our system (Figure 5). An addition of a two fold molar excess of purified sIL-2R $\alpha$  (1  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) in the IL-2 stimulated cells had a significant inhibitory effect on the NK cells activity. To further evaluate the interaction of sIL-2R $\alpha$  and IL-2, the amount of cytokine was increased by five to ten fold which lead to a lack of effect due to an excess of IL-2. We therefore concluded that molar excess of sIL-2R $\alpha$  acts as an antagonist by competing with the intermediate affinity receptors expressed in NK cells.

## **6. Effect of soluble recombinant sIL-2R $\alpha$ on the mitogenic response of PBMC.**

One of the major role of IL-2 is to allow the T cells proliferation after stimulation. Absence of IL-2 in the media of stimulated T cells induce the cell's dead by apoptosis. Effects of sIL-2R $\alpha$  on the mitogenic response of PBMC were analyzed by  $^3\text{H}$ -thymidine uptake (Figure 6). The addition of increasing amounts of sIL-2R $\alpha$  between 0 to 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  caused a significant decrease of the basal uptake of unstimulated cells (Figure 6A). This decrease was not associated with an increase of mortality or apoptosis in the cell culture (data not shown). Additions of 10 U/ml of IL-2 resulted in a partial reversal of this effect. Stimulation of PBMC with PHA, a T cells mitogen, in the presence of sIL-2R $\alpha$  resulted in no significant decrease in lymphocyte proliferation. These results indicate that sIL-2R $\alpha$  can decrease the metabolic activity of PBMC but fail to inhibit the T cell activation.

## **7. Soluble form of IL-2R $\alpha$ induce a dissociated production of IL-2 and INF- $\gamma$ by CD4 $^+$ lymphocytes.**

Stimulated T cells, more precisely CD4 $^+$  lymphocytes, produce many cytokines that can influence each other. It is known that the cytokine environment during early T-cell activation can determine the dominant cytokine profile of the T cells response (66). Two major cytokines, IL-4 and INF- $\gamma$ , exert opposite effects on a variety of immune parameters (66) and can be used to classified TH1 and TH2 subsets. To determine the effect of sIL-2R $\alpha$  on the cytokines produced by T cells, we have stimulated PBMC with anti-CD3 in presence or absence of sIL-2R $\alpha$ . Intracellular cytokine production was analyzed by flow cytometry. Triple labelling of cells with anti-CD4, anti-INF- $\gamma$  and anti-IL-4 or anti-IL-2 were used to determine the cytokine production in CD4 $^+$  T cells. In all experimental conditions tested, no changes were observed when gated CD4 $^+$  cells were analyzed for intracellular IL-4 and IL-2 proteins (data not shown). Purified sIL-2R $\alpha$  had no effect on the number of CD4 $^+$  T cells expressing INF- $\gamma$  (Figure 7A). Addition of recombinant IL-2 increased the % positive cells. In this short-term culture,

IL-4 had no effect on the percentage of positive cells. It was reported that the addition of exogenous IL-2 enhanced the induction on INF- $\gamma$  (67). We have analyzed our results for the intracellular contents of INF- $\gamma$  protein by comparing the mean fluorescence value (Figure 7B). Stimulation of PBMC by OKT-3 gave the same levels of intracellular INF- $\gamma$  independent of the presence of sIL-2R $\alpha$ . However, sIL-2R $\alpha$  abrogated the enhancement of cellular INF- $\gamma$  when exogenous recombinant IL-2 was added. Co-addition of IL-4 and IL-2R decreased the amount of INF- $\gamma$  proteins by approximately 50% which then be restored by the addition of IL-2. We concluded from this experiment that the purified form of sIL-2R $\alpha$  dissociated the production of IL-2 and INF- $\gamma$ . Moreover, the addition IL-4 and sIL-2R $\alpha$  causes a dramatic decrease in INF- $\gamma$  protein content and can possibly increase the emergence of TH2 subset .

## DISCUSSION

After burn trauma an increase in sIL-2R $\alpha$  was noted (39,40,55,61). In this study we showed for the first time that the sIL-2R $\alpha$  secreted is a truncated form of IL-2R $\alpha$ . This form of receptor is monomeric since we were unable to demonstrate, in non-reducing conditions, the presence of a high molecular form nor by western analysis the presence of other chains of the IL-2R complex (data not shown). The form of IL-2R $\alpha$  present in the serum of burn patients inhibits IL-2-dependent proliferation from murine cells. However, as reported in other pathologies, inhibition of cell proliferation using human origin cell lines could not be directly caused by the presence of sIL-2R $\alpha$ . We also confirmed that there are other soluble factors present in these sera which inhibit cell proliferation. Phenotyping analysis presented a marked decrease of the T cell population after burn trauma and no activating markers were demonstrated on the remaining T lymphocytes (IL-2R, CD69 or HLA-DR, data not shown). The analysis of class II MHC molecule expression in blood cells demonstrated a significant decrease of these molecules at the cell surface of non-T cells and CD11b<sup>+</sup> cells. The class II transactivator is a protein that induces the transcription of MHC class II genes and it is believed to be required for both constitutive and IFN- $\gamma$  inducible expression of these

genes (69,70). Decrease of MHC class II molecules found in our study and others (71) after burn trauma can be linked partly to the diminished production of  $\text{INF-}\gamma$ . The majority of non-T cells include B lymphocytes and monocytes/macrophages, in which the cell's expression of class II MHC molecules are under the control of  $\text{INF-}\gamma$ .

The inflammatory response following burn injury, correlated positively with increasing concentrations of sIL-2R $\alpha$ , as demonstrated by IL-6 production. This correlation was also observed in HIV patients and in several other inflammatory diseases (29-34). Even if some of the studies show the prognostic value of the sIL-2R $\alpha$  concentration, the source and the role of IL-2R $\alpha$  remain speculative. Generally the presence of sIL-2R $\alpha$  was associated with the stimulation or activity of T cells in course of development. However the absence of T cells activation markers in PBMC in trauma patients is incompatible with this hypothesis. The probability of the local T cell's response generating such a large amount of this protein in the serum is unlikely. Another possibility is that the source of sIL-2R $\alpha$  came from an unusual cell stimulated to express this molecule. Several reports have shown that non T-cells, such monocytes/macrophages, B lymphocytes, neuronal, glial and pituitary cells express at their cells surface the IL-2R $\alpha$  which can account for its presence in the serum of trauma patients (36,45,47-49,72,73). Interestingly, it was reported that an increase of sIL-2R $\alpha$  was detectable within hours following injury, before any detectable increase of IL-2 (13), suggesting that T cells activation cannot be responsible of the presence of sIL-2R $\alpha$ . The latter suggests that a massive production or shedding of this receptor takes place in an other tissue that constitutively express this receptor. The exact origin of the soluble receptor remains to be determined.

Other findings in this study are the magnitude of the inflammatory response and the associated release of sIL-2R $\alpha$  in function of the % of fat in th diet. We have previously demonstrated that a low fat diet decreases the inflammatory response, the number of infection and length of care of burn patients (56,57). An excessive activation of monocytes is known to occur after a major trauma (74). Monocytes then rapidly



produce and release prostaglandin E2 (PGE2), a powerful endogenous immune suppressant (75). Indeed, PGE2 is known to be an inhibitor of mitogenesis, IL-2 production, and IL-2 receptor expression in T-cells. The amount and type of lipid intake in the diet can also contribute to the production of arachidonic acid metabolites that include PGE2. In burn patients monocytosis was observed to be associated with a significant increase of PGE2 (74). We can hypothesize that the administration of a low lipid diet can influence the PGE2 production in those patients. However, low fat diets containing n-3 lipids had no effect in our study demonstrating that the amount of dietary lipid is the predominant factor effecting the inflammatory response in burn patient. The exact mechanism of the beneficial effect of low fat diet is currently under investigation in our laboratory.

The concentration of the soluble form of IL-2R $\alpha$  has been shown to be elevated in the supernatant of T cells after their activation (15). High levels of sIL-2R $\alpha$  has also been demonstrated in several diseases with different ethiology (26-40). The significance of the presence of this molecule remains unresolved. In this study we have used a purified form of sIL-2R $\alpha$  to determine its influence on several parameters of the immune response involving IL-2. Our results prove that sIL-2R $\alpha$  cannot compete with the high affinity form of this receptor on the cell's surface for the binding of IL-2. However, the IL-2 mediated functions involving cells expressing the IL-2R with an intermediate affinity, can be perturbed in presence of an excess of sIL-2R $\alpha$ . Indeed, we illustrated that increased NK activity in the presence of IL-2 was inhibited in the presence of a molar excess sIL-2R $\alpha$ . In sera of patients with hairy cell leukemia appear to have values of sIL-2R $\alpha$  inversely related to the NK function displayed by PBMC from the same patients (76). Decreased NK activity was demonstrated in several other diseases in which a high level of sIL-2R $\alpha$  was found (45,76). Study on IL-2 mediated enhancement of immune cells function have suggested a positive action of this cytokine on neutrophil function (77,78). However, we failed to demonstrate any effect of IL-2 or sIL-2R $\alpha$  on neutrophils activity. Our results on the action of IL-2 on neutrophils are in agreement with the results of other laboratories (79).

Our results suggest that the role of recombinant sIL-2R $\alpha$  as an antagonist of IL-2 for the T cells proliferation shown is unlikely. Using a purified form of sIL-2R $\alpha$  from serum or from urine of patients with elevated concentrations of this receptor, different laboratories showed an inhibitory effect of the protein isolated, although other groups failed to confirm these results (37,53,54,80). The discrepancy between these results can be explained by the work of Dummer et al (81) which stipulates that circulating sIL-2R $\alpha$  are a group of multimeric proteins rather than a homogenous compartment. The formation of high affinity complexes including  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  chains can increase their affinities for IL-2 and subsequently compete adequately with membrane receptors expressed by immune cells. We have found that the basal activity of unstimulated cells decreased in the presence of sIL-2R $\alpha$  and can be partly restored by the addition of exogenous IL-2. Since IL-2's high affinity receptors were absent in resting lymphocytes, it remains possible that a low amount of sIL-2R $\alpha$  can down regulate the basal activities of monocytes or lymphocytes by trapping the low amount of IL-2 produced by PBMC population.

One of the most intriguing results obtained after stimulation of PBMC in presence of recombinant sIL-2R $\alpha$ , was the dissociated INF- $\gamma$  production. This effect was previously reported in other circumstances and in pathologies where the increase of sIL-2R $\alpha$  was demonstrated (82-85). Although we were unable to demonstrate an increase in IL-4 synthesis under the conditions used in this experiment, the results suggest a role of sIL-2R $\alpha$  in relation with the TH1/TH2 balance. We hypothesized that recombinant IL-2R $\alpha$  can bind to IL-2 decreasing the IL-2 concentration in the cell's environment eliciting a predominantly TH2 population. The synergetic effect of IL-4 on the decrease of INF- $\gamma$  production and the partial restoration of INF- $\gamma$  production after addition of IL-2 support our findings. Interestingly, the presence of sIL-2R $\alpha$  was demonstrated after burn trauma and in systemic lupus erythematosus; two pathological conditions associated with the predominant production of cytokines from TH2 populations (86-88) indicating the possible relation between the presence of sIL-2R $\alpha$  and the TH1 or TH2 populations.

The role of the IL-2R in the burn trauma remains unclear. Like other receptors (such as : TNFR, IL-1R $\alpha$ ), it is suggested that the sIL-2R $\alpha$  acts by binding and inactivating circulating IL-2. However, our results with a highly purified recombinant form of sIL-2R $\alpha$  showed that this receptor can compete only with the receptor of intermediate affinity, when high concentrations were used. Elevated concentrations of sIL-2R $\alpha$  could possibly contribute indirectly to the immunosuppression seen after a traumatic injury. Surprisingly, sIL-2R $\alpha$  levels are higher in non-surviving trauma patients than in surviving ones supporting the prognostic value of this receptor. In burn patients, there is an increase of sIL-2R $\alpha$  and the immunosuppression state is generally correlated with its concentration. Our results proved that the presence of sIL-2R $\alpha$  cannot explain the T cell's dysfunction in burn patients, although some modifications of the immune parameters can be influenced by their presence.

#### **ACKNOWLEDGMENT**

We thank Dr Tom Ciardelli (Darmouth Medical School, Hanover, NH) for giving the IL-2R $\alpha$  extracellular domain and Dr M Tremblay (Laval University) and Dr P Hugo (Procrea) for the IL-2 dependant T cell lines. The authors are thankful to C. Hamelin for technical help and reading the manuscripts.

**References.**

1. Nelson BH, Willerford DM: Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol* 70:1, 1998.
2. Sharon M, Klausner RD, Cullen BR, Chizzonite R, Leonard WJ. Novel interleukin-2 receptor subunit detected by cross-linking under high affinity conditions. *Science* 234: 859, 1986.
3. Kondo S, Shimizu A, Saito Y, Kinoshita M, Honjo T. Molecular basis for two different affinity states of the interleukin 2 receptor affinity conversion model. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 83:9026, 1986.
4. Hatakeyama M, Tsudo M, Minamoto S, Kono T, Doi T, Miyata T, Miyasaka M, Taniguchi T. Interleukin-2 receptor beta chain gene: generation of three receptor forms by cloned human alpha and beta chain cDNA's. *Science* 244:551, 1989.
5. Takeshita T, Asao H, Suzuki J, Sugamura K. An associated molecule, p64, with high-affinity interleukin 2 receptor. *Int Immunol* 2:477, 1990.
6. Takeshita T, Asao H, Ohtani K, Ishii N, Kumaki S, Tanaka N, Munakata H, Nakamura M, Sugamura K. Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor. *Science* 257: 379, 1992.
7. Taniguchi T, Minami Y. The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell* 73:5, 1993.
8. Kamio M, Uchiyama T, Arima N, Itoh K, Ishikawa T, Hori T, Uchino H : Role of  $\alpha$  chain – IL-2 complex in the formation of the ternary complex of IL-2 and high-affinity IL-2 receptor. *International Immunology* 2:521, 1990.

9. Nelson BH, Lord JD, Greenberg PD : Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor  $\beta$  and  $\gamma$  chains mediate the signal for T-cell proliferation. *Nature* 369:333, 1994.
10. Loughnan MS, Nossal GJV : A regulatory Role for the Soluble IL-2 Receptor via Competition with the p75 Cell-Surface Form of the Receptor for IL-2. *J Mol Cell Immunol* 4:307, 1990.
11. Giri JG, Kumaki S, Ahdieh M, Friend DJ, Loomis A, Shanebeck K, DuBose R, Cosman D, Park LS, Anderson DM. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *EMBO J* 14:3654, 1995.
12. Rubin L.A., Nelson D.L. The soluble interleukin-2 receptor : Function, and clinical application. *Ann Inter Med* 113:619, 1990.
13. Cinat M, Waxman K, Vaziri ND, Daughters K, Yousefi S, Scannell G, Tominaga GT : Soluble cytokine receptors and receptor antagonists are sequentially released after trauma. *J Trauma* 39:112, 1995.
14. Matsumoto K, Taki F, Miura M, Matsuzaki M, Takagi K : Serum levels of soluble IL-2R, IL-4, and soluble Fc epsilon RII in adult bronchial asthma. *Chest* 105:681, 1994.
15. Rubin L.A., Kurman C.C., Fritz M.E., Biddison W.E., Boutin B., Yarchoan R., Nelson D.L. Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro. *J. Immunol.* 135:3172, 1985.

16. Karlsson H, Nassberger L : Influence of compounds affecting synthesis, modification and transport of proteins on the expression and release of interleukin-2 receptor. *Immunol Cell Biol* 73:81, 1995.
17. Rubin LA, Jay G, Nelson DL. The released interleukin-2 receptor binds interleukin 2 efficiently. *J Immunol* 137: 3841, 1986.
18. Sayar D, Ketzinel M, Gerez L, Silberberg C, Reshef A, Kaempfer R : Expression of the human IL-2 receptor on lymphocytes involves rapid turnover of its p55  $\alpha$ -Subunit (Tac). *J Immunol* 145:2946, 1990.
19. Mullberg J, Rauch CT, Wolfson MF, Castner B, Fitzner JN, Otten-Evans C, Mohler KM, Cosman D, Black RA : Further evidence for a common mechanism for shedding of cell surface proteins. *FEBS Lett* 401:235, 1997.
20. Gallea-Robache S, Morand V, Millet S, Bruneau JM, Bhatnagar N, Chouaib S, Roman-Roman S : A metalloproteinase inhibitor blocks the shedding of soluble cytokine receptors and processing of transmembrane cytokine precursors in human monocytic cells. *Cytokine* 9:340, 1997.
21. Loughnan M.S., Sanderson C.J., Nossal G.J.V. Soluble interleukin-2 receptors are release from the cell surface of normal murine B lymphocytes stimulated with interleukin 5. *Proc Natl Acad Sci* 85:3115, 1988.
22. Müllberg J, Rauch CT, Wolfson MF, Castner B, Fitzner JN, Otten-Evans C, Mohler KM, Cosman D, Black RA : Further evidence for a common mechanism for shedding of cell surface proteins. *FEBS Lett* 401:245, 1997.
23. Rimoldi D, Salvi S, Hartmann F, Schreyer M, Blum S, Zografos L, Plaisance S, Azzarone B, Carrel S. Expression of IL-2 receptors in human melanoma cells. *Anticancer Res* 13:555, 1993.

24. Alileche A, Plaisance S, Han DS, Rubinstein E, Mingari C, Bellomo R, Jasmin C, Azzarone B. Human melanoma cell line M14 secretes a functional interleukin 2. *Oncogene* 8:1791, 1993.
25. Plaisance S, Rubinstein E, Alileche A, Han DS, Sahraoui Y, Mingari MC, Bellomo R, Rimoldi D, Colombo MP, Jasmin C, et al. Human melanoma cells express a functional interleukin-2 receptor. *Int J Cancer* 55: 64, 1993.
26. Mattei S, Colombo MP, Melani C, Silvani A, Parmiani G, Herlyn M. Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes. *Int J Cancer* 56:853, 1994.
27. Boyano MD, Garcia-Vazquez MD, Gardeazabal J, Garcia de Galdeano A, Smith-Zubiaga I, Canavate ML, Raton JA, Bilbao I, Diaz-Perez JL. Serum-soluble IL-2 receptor and IL-6 levels in patients with melanoma. *Oncology* 54:400, 1997.
28. Caruso C, Modica MA, Candore G, Di Giulio C, Galluzzo A, Giordano C, Di Marco P, Gebbia V, Tamone Reyes M, Citarrella P. Soluble interleukin-2 receptor in vitro production by mononuclear cells from Hodgkin patients. *Boll Ist Sieroter Milan* 69:335, 1990.
29. Nelson DL, Kurman CC. Targeting human IL-2 receptors for diagnosis and therapy. *Proc Soc Exp Biol Med* 206:309, 1994.
30. Perkins JD, Nelson DL, Rakela J, Grambsch PM, Krom RA. Soluble interleukin 2 receptor level in liver allograft recipients: an indicator of rejection. *Transplant Proc* 21: 2275, 1989.
31. Honda M, Kitamura K, Matsuda K, Yokota Y, Yamamoto N, Mitsuyasu R, Chermann JC, Tokunaga T : Soluble IL-2 receptor in AIDS. Correlation of its

- serum level with the classification of HIV-induced diseases and its characterization. *J Immunol* 142:4248, 1989.
32. Honda M, Kitamura K, Mizutani Y, Oishi M, Arai M, Okura T, Igarahi K, Yasukawa K, Hirano T, Kishimoto T and others. : Quantitative analysis of serum IL-6 and its correlation with increased levels of serum IL-2R in HIV-induced diseases. *J Immunol* 145:4059, 1990.
  33. Greenberg SJ, Marcon L, Hurwitz BJ, Waldmann TA, Nelson DL. Elevated levels of soluble interleukin-2 receptors in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 319:1019, 1988.
  34. Sharief MK, Hentges R, Thompson EJ. The relationship of interleukin-2 and soluble interleukin-2 receptors to intrathecal immunoglobulin synthesis in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 32:43, 1991.
  35. Elg SA, Hill RB, Heldman L, Ramakrishnan S : The *in Vitro* Effect on T Cell Function of Soluble IL-2R $\alpha$  from Advanced Ovarian Cancer Ascites. *Gynecologic Oncology* 66 : 133, 1997.
  36. Kay NE, Burton J, Wagner D, Nelson DL : The malignant B cells from B-Chronic lymphocytic leukemia patients release TAC-soluble interleukin-2 receptors. *Blood* 72 : 447, 1998.
  37. Miossec P, Elhamiani M, Edmonds-Alt X, Sany J, Hirn M : Functional studies of soluble low-affinity interleukin-2 receptors in rheumatoid synovial fluid. *Arthritis Rheum* 33 : 1688, 1990.
  38. Nielsen O.H., Ciardelli T., Wu Z., Langholz E., Kirman I. Circulating soluble interleukin-2 receptor  $\alpha$  and  $\beta$  chain in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterology*. 90:1301, 1995.



39. Teodorczyk-Injeyan JA, Sparkes BG, Mills GB, Falk RE, Peters WJ : Increase of Serum Interleukin 2 Receptor Level in Thermally Injured Patients. *Clinical Immunology and Immunopathology* 51 : 205, 1989.
40. Teodorczyk-Injeyan JA, Sparkes BG, Mills GB, Peters WJ : Soluble interleukin 2-receptor  $\alpha$  secretion is related to altered interleukin 2 production in thermally injured patients. *Burns* 17 : 290, 1991.
41. Delogu G., Casula A., Mancini P., Tellan G., Signore L. Serum neopterin and soluble interleukin-2 receptor for prediction of a shock state in gram-negative sepsis. *Journal of critical care.* 10: 64, 1995.
42. Kullich W : Correlation of interleukin-2 receptor and neopterin secretion in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 12 : 387, 1993.
43. Bodey B, Psenko V, Lipsey AL, Kaiser HE. Soluble interleukin-2 receptors in sera of children with primary malignant neoplasms. *Anticancer Res* 16: 219, 1996.
44. Manoussakis MN, Papadopoulos GK, Drosos AA, Moutsopoulos HM. Soluble interleukin 2 receptor molecules in the serum of patients with autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 50: 321, 1989.
45. Burton J, Kay NE : Does IL-2-receptor expression and secretion in chronic B-cell leukemia have a role in down-regulation of the immune system? *Leukemia* 8 : 92, 1994.
46. Artz E, Buric R, Stelzer G, Stalla J, Sauer J, Renner U, Stalla Gk : Interleukin involvement in anterior pituitary cell growth regulation : effects of IL-2 and IL-6. *Endocrinology* 132 : 459, 1993.

47. Arzt E, Stalla GK : Cytokines : autocrine and paracrine roles in the anterior pituitary. *Neuroimmunomodulation* 3 : 28, 1996.
48. Arzt E, Stelzer G, Renner U, Lange M, Müller OA, Stalla GK : Interleukin-2 and Interleukin-2 Receptor Expression in Human Corticotrophic Adenoma and Murine Pituitary Cell Cultures. *J. Clin. Invest.* 90 : 1944, 1992.
49. Krause A, Henrich A, Beckh KH, Von Wichert P, Baerwald C : Correlation between density of beta 2-adrenergic receptors on peripheral blood mononuclear cells and serum levels of soluble interleukin-2 receptors in patients with chronic inflammatory diseases. *Eur J Clin Invest* 22 : 47, 1992.
50. Gooding R, Riches P, Dadian G, Moore J, Gore M : Increased soluble interleukin-2 receptor concentration in plasma predicts a decreased cellular response to IL-2. *British Journal of Cancer* 72 : 452, 1995.
51. Peters M, Odenthal M, Schirmacher P, Blessing M, Fattori E, Ciliberto G, Meyer zum Buschenfelde KH, Rose-John S : Soluble IL-6 receptor leads to a paracrine modulation of the IL-6-induced hepatic acute phase response in double transgenic mice. *J Immunol* 159 : 1474, 1997.
52. Miossec P, Elhamiani M, Edmonds-Alt X, Sany J, Hirn M : Functional studies of soluble low-affinity interleukin-2 receptors in rheumatoid synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 33 : 1688, 1990.
53. Pizzolo G, Vincenzi C, Vinante F, Rigo A, Veneri D, Chilosi M, Dusi S, Poli G, Zambello R, Semenzato G and others. Highly concentrated urine-purified Tac peptide fails to inhibit IL-2-dependent cell proliferation in vitro. *Cell Immunol* 141 : 253, 1992.

54. Waldner C, Mongini C, Alvarez E, Roig I, Hajos SE : Inhibitory activity of soluble IL-2R in sera, ascites and culture supernatants from murine leukaemic cells. *Scand J Immunol* 40 : 308, 1994.
55. Teodorczyk-Injeyan JA, Sparkes BG, Peters WJ : Serum Interleukin-2 Receptor as a Possible Mediator of Immunosuppression After Burn Injury. *Journal of Burn Care & Rehabilitation* 10 : 112, 1989.
56. Bernier J, Jobin N, Emptoz-Bonneton A, Pugeat MM, Garrel DR Decreased corticosteroid-binding globulin in burn patients: relationship with interleukin-6 and fat in nutritional support. *Crit Care Med* 26: 452, 1998.
57. Garrel DR, Razi M, Lariviere F, Jobin N, Naman N, Emptoz-Bonneton A, Pugeat MM Improved clinical status and length of care with low-fat nutrition support in burn patients. *J Parenter Enteral Nutr* 19: 482, 1995.
58. Wu Z, Johnson KW, Choi Y, Ciardelli TL : Ligand Binding Analysis of Soluble Interleukin-2 Receptor Complexes by Surface Plasmon Resonance. *The Journal of Biological Chemistry* 270 : 16045, 1995.
59. Chang L, Gusewitch GA, Chritton DB, Folz JC, Lebeck LK, Nehlsen-Cannarella SL. Rapid flow cytometric assay for the assessment of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 166: 45, 1993.
60. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680, 1970.
61. Schinkel C., Zimmer S., Durda P.J., Höcherl E., Herndon D.N., Faist E. Kinetics of soluble interleukin-2 receptor after mechanical and burn trauma. *J Burn Care Rehabil* . 18:210, 1997.

62. O'Sullivan ST, O'Connor TPF: Immunosuppression following thermal injury : the pathogenesis of immunodysfunction. *British Journal of Plastic Surgery* 30 : 615, 1997.
63. Trinchieri G, Matsumoto-Kobayashi M, Clark SC, Sehra J, London L, Perussia B : Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2. *J Exp Med* 160 : 1147, 1984.
64. Miyasaka N, Darnell B, Baron S, Talal N : Interleukin 2 enhances natural killing of normal lymphocytes. *Cell Immunol* 84 : 154, 1984.
65. Domzig W, Stadler BM, Herberman RB : Interleukin 2 dependence of human natural killer (NK) cell activity. *J Immunol* 130 : 1970, 1983.
66. Kelso A. Th1 and Th2 subsets : paradigms lost? *Viewpoint. Immunol Today* 16:374, 1995.
67. Pearlstein KT, Palladino MA, Welte K, Vilcek J : Purified human interleukin-2 enhances induction of immune interferon. *Cell Immunol* 80 : 1, 1983.
68. Wagner F, Fischer N, Lersch C, Hart R, Dancygier H : Interleukin 4 inhibits the interleukin 2-induced production of its functional antagonist, interferon gamma. *Immunol Lett* 21 : 237, 1989.
69. Giacomini P, Fisher PB, Duigou GJ, Gambari R, Natali PG : Regulation of class II MHC gene expression by interferons : insights into the mechanism of action of interferon (review). *Anticancer Res* 8 : 1153, 1988.
70. Wong GH, Clark-Lewis I, McKimm, Breschkin L, Harris AW, Schrader JW : Interferon-gamma induces enhanced expression of Ia and H-2 antigens on B lymphoid, macrophage, and myeloid cell lines. *J Immunol* 131 : 788, 1983.

71. Zwadlo-Klarwasser G, Kauhl W, Schmitz C, Hettich R. Influence of severe burn injury on the expression of RM 3/1 and HLA-DR antigens in human blood monocytes. *J Burn Care Rehabil* 17: 287, 1996.
72. Smith LR, Brown SL, Blalock JE : Interleukin-2 induction of ACTH secretion : Presence of an interleukin-2 receptor alpha-chain-like molecule on pituitary cells. *J Neuroimmunol* 21 : 249, 1989.
73. Kronin V, Vremec D, Shortman K : Does the IL-2 receptor alpha chain induced on dendritic cells have a biological function? *Int Immunol* 10 : 237, 1998.
74. Faist E, Schinkel C, Zimmer S. Update on the mechanisms of immune suppression of injury and immune modulation. *World J Surg* 20: 454, 1996.
75. Faist E, Mewes A, Baker CC, Strasser T, Alkan SS, Rieber P, Heberer G : Prostaglandin E2 (PGE2)-dependent suppression of interleukin alpha (IL-2) production in patients with major trauma. *J Trauma* 27: 837, 1987.
76. Chilosi M, Semenzato G, Cetto G, Ambrosetti A, Fiore-Donati L, Perona G, Berton G, Lestani M, Scarpa A, Agostini C et al : Soluble interleukin-2 receptors in the sera of patients with hairy cell leukemia : relationship with the effect of recombinant alpha-interferon therapy on clinical parameters and natural killer in vitro activity. *Blood* 70 : 1530, 1987.
77. Pericle F., Liu J.H., Diaz J.I., Blanchard D.K., Wei S., Forni G., Djeu J.Y. Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils. *Eur. J.Immunol.* 24:440, 1994.
78. Djeu JY, Liu JH, Wei S, Rui H, Pearson CA, Leonard WJ, Blanchard DK. Function associated with IL-2 receptor-beta on human neutrophils. *Mechanism*

- of activation of antifungal activity against *Candida albicans* by IL-2. *J Immunol* 150:960, 1993.
79. Girard D, Gosselin J, Heitz D, Paquin R, Beaulieu AD : Effects of Interleukin-2 on Gene Expression in Human Neutrophils. *Blood* 86:1170, 1995.
80. Damle RN, Advani SH Gangal SG : Analysis of regulation of T-cell responses by soluble inhibitory factors from the sera of patients with Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 50:192, 1992.
81. Dummer R, Posseckert G, Sugamura K, Grundmann H, Burg G : Circulating interleukin-2 receptors are a group of multimeric proteins with immunoreactivity for interleukin-2 receptor alpha, beta and gamma chains. *J Interferon Cytokine Res* 16:315, 1996.
82. Myawaki T, Seki H, Taga K, Sato H, Taniguchi N : Dissociated production of interleukin-2 and immune ( $\gamma$ ) interferon by phytohaemagglutinin stimulated lymphocytes in healthy infants. *Clin. exp. Immunol* 59:505, 1985.
83. Rodriguez-Zapata M, Salmeron, Manzano L, Salmeron OJ, Prieto A, Alvarez-Mon M : Defective interferon-gamma production by T-lymphocytes from patients with acute brucellosis. *European Journal of Clinical Investigation* 26:136, 1996.
84. Giordano C, Caruso C, Panto F, Modica MA, Zambito AM, Amato MP, Galluzzo A : Dissociated production of interleukin-2 and immune gamma-interferon by phytohaemoagglutinin stimulated peripheral mononuclear cells in type 1 (insulin-dependent) diabetes. *J Clin Lab Immunol* 27:73, 1988.

85. Reinhold U, Wehrmann W, Kukel S, Kreysel HW : Evidence that defective interferon-gamma production in atopic dermatitis patients is due to intrinsic abnormalities. *Clin. Exp Immunol* 79: 374, 1990.
86. O'Sullivan ST, Lederer JA, Horgan AF, Chin DH, Mannick JA, Rodrick ML. Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Ann Surg* 222:482, 1995.
87. Kelly JL, Lyons A, Soberg CC, Mannick JA, Lederer JA. Anti-interleukin-10 antibody restores burn-induced defects in T-cell function. *Surgery* 122:146, 1997.
88. Funachi M, Ikoma S, Enomoto H, Horiuchi A : Decreased Th1-like and increased Th2-like cells in systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 27:219, 1998.

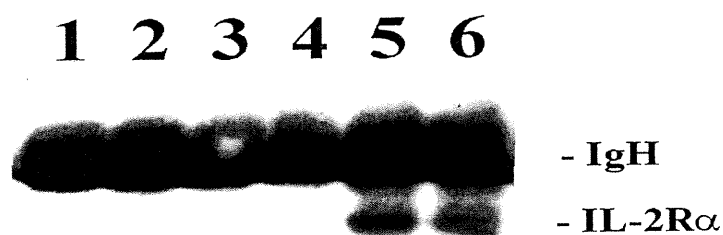
## **TABLES ET GRAPHIQUES**



Table 1. Burn patient's characteristics.

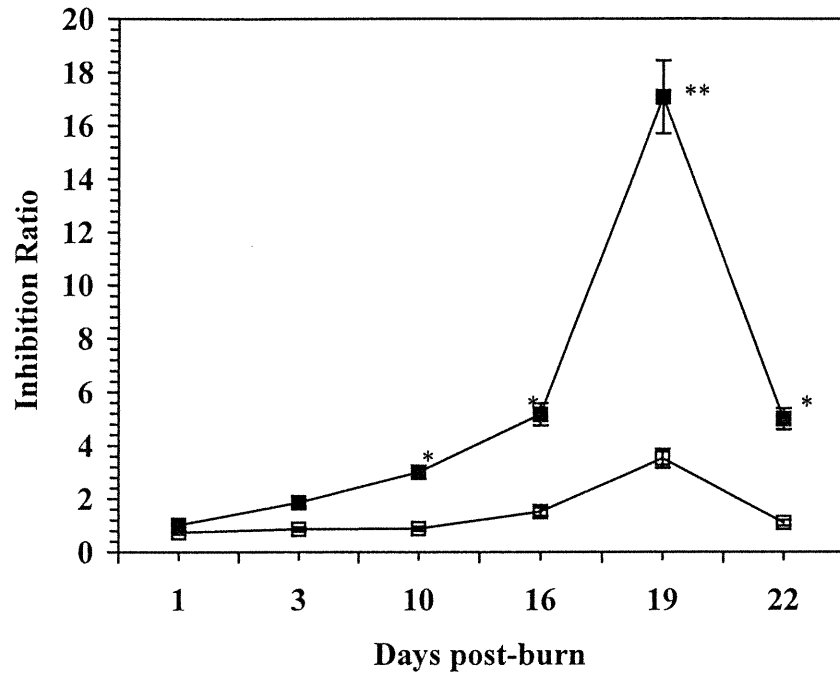
Group	No. Patients	Age (year)	Weight (kg)	Height (cm)	TBSA %
Control	6	37±13	79,2±22,9	176±12	43,8±16,2
Low Fat 1	6	38±7,7	81,5±15,2	177±8	46,7±12,2
Low Fat 2	6	39,2±13,4	69,5±14,51	169±13	44,8±9,6

**Figure 1. :** Truncated form of IL-2R $\alpha$  is present in burn patient serum



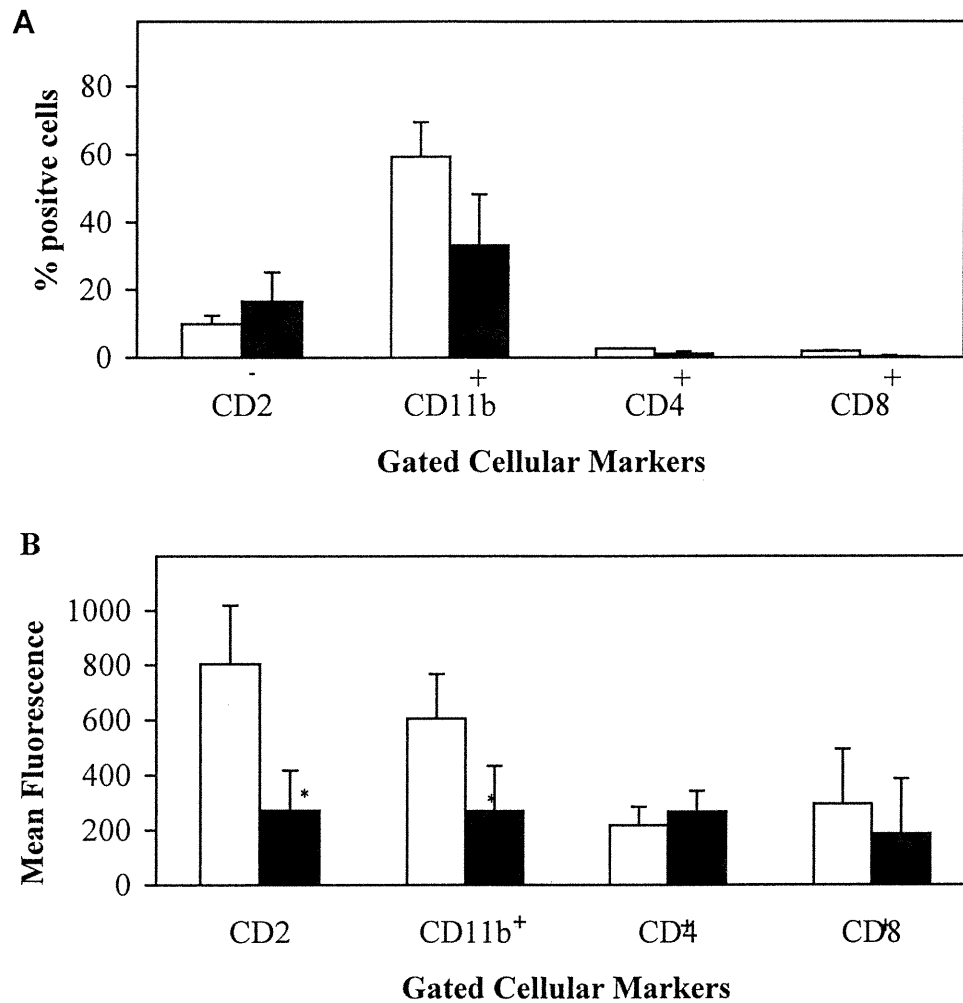
Serum from five normal patients were pooled, and IL-2R $\alpha$  was immunoprecipitated. Anti-IL-2R $\alpha$  Ab specific to the C-terminal amino acid sequence (lane 1 to 3) or specific to the N-terminal amino acid sequence (lane 4 to 6) were used for immunoprecipitated. The presence of IL-2R $\alpha$  was revealed by Western Blot analyses with anti-IL-2R $\alpha$  antibody. Bands for Ig heavy chain (IgH) and IL-2R $\alpha$  are indicated. The determined molecular weight is 43 KDa.

**Figure 2:** Proliferation of murine but not human IL-2 dependant T cells lines were inhibited by sera containing the soluble form of IL-2R $\alpha$



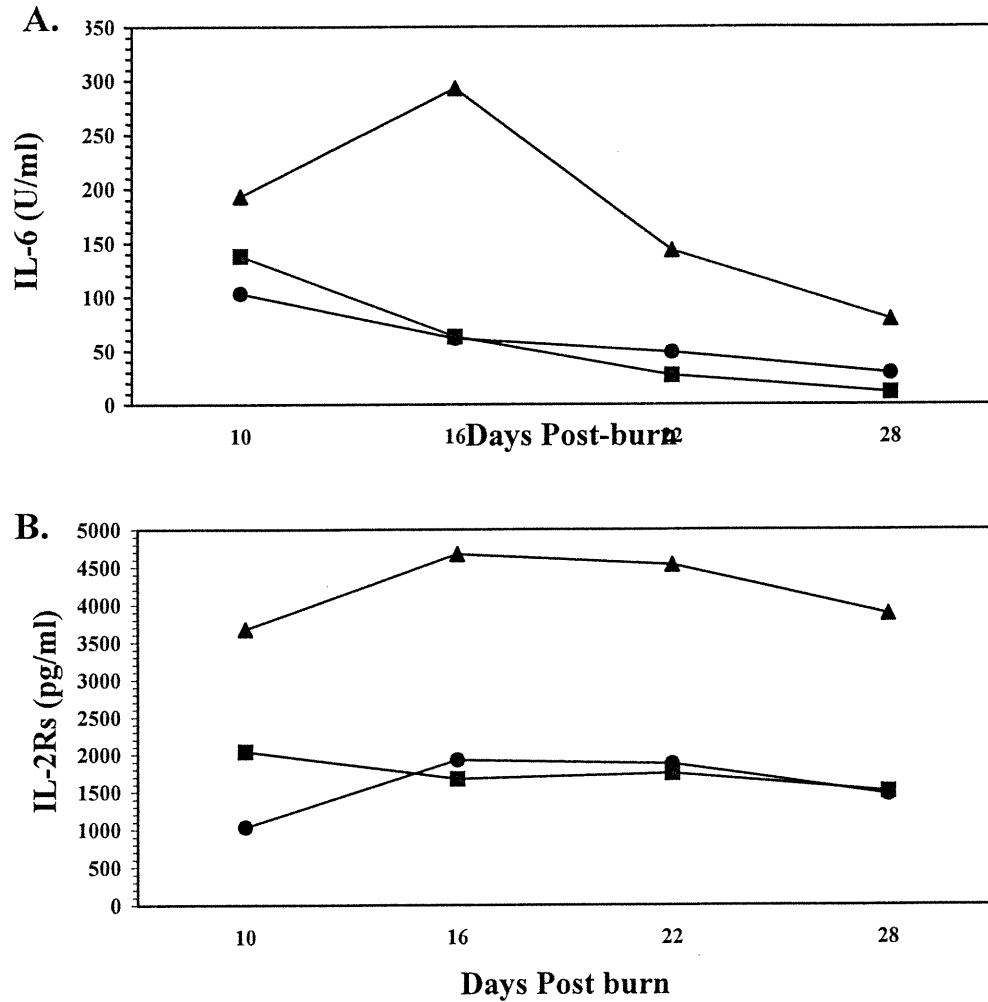
Interleukin-2 dependant murine HT-2 cells or human W1710 cells were incubated in presence of 10% of decompemented burn serum or with normal serum in medium containing 5 or 50 U/ml of recombinant IL-2 from human origin (white square) or murin origin (black square). Proliferations were assessed after 18 h incubation and the results were presented as inhibition ratio determined by comparing the response at higher concentration and lower concentration of IL-2. This representation was used to demonstrate the effects related to the presence of IL-2R $\alpha$  as compared to other inhibitory factors present in burn serum. Normal serum from healthy donors caused no modifications of this ratio. Results are representative of 6 independant experiements performed with 10 burn patients. No inhibitions were observed with human cell lines in presence of human IL-2 and 100% inhibition was observed with murin IL-2.

**Figure 3.** Expression of MHC classe II molecule in blood cells from burn patients



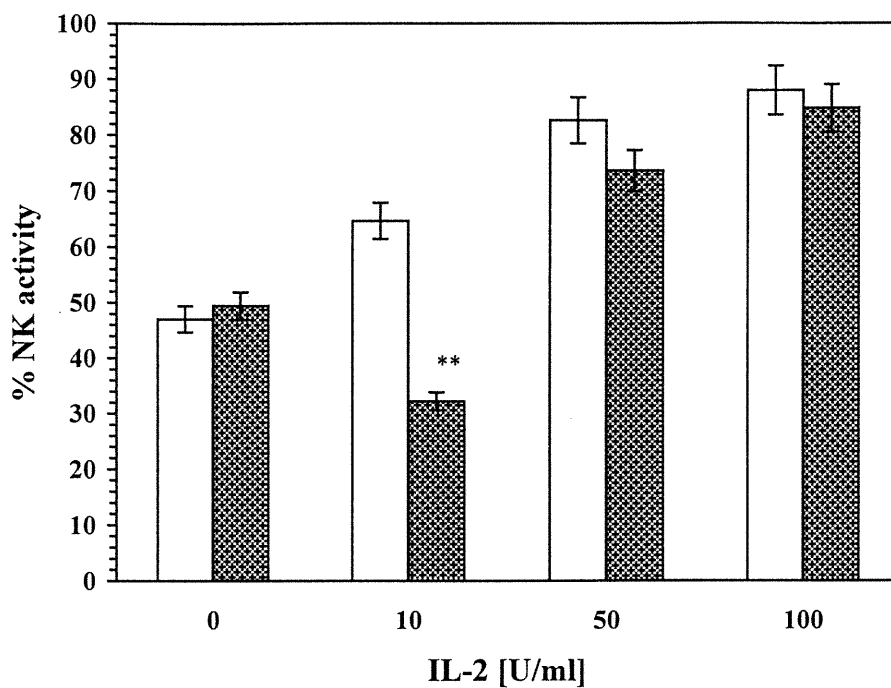
Expression of DR molecules was based on lymphocyte population identified with forward side scatter and side scatter by live gate and the expression of DR molecules was determined on CD2<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells. Total populations were analysed for the CD11b<sup>+</sup> expression. Positive cells for DR molecules for each population was shown in % (A). Level of expression of the DR molecule on gated cells was determined by mean fluorescence on each population analysed as describe in A (B). Results were obtained from 5 blood samples of healthy donors (White bar) or 10 blood samples from burn patients ten days following the trauma (black bar). No differences in % of cells expressing DR molecule were noted (A). Significant decreases of DR expression were noted for CD2<sup>-</sup> and CD11b<sup>+</sup> cells after burn injury (B: \*  $p \leq 0.05$ ).

**Figure 4.** Low fat diet administration was associated with lower amount of IL-6 and the sIL-2R in burn patients.



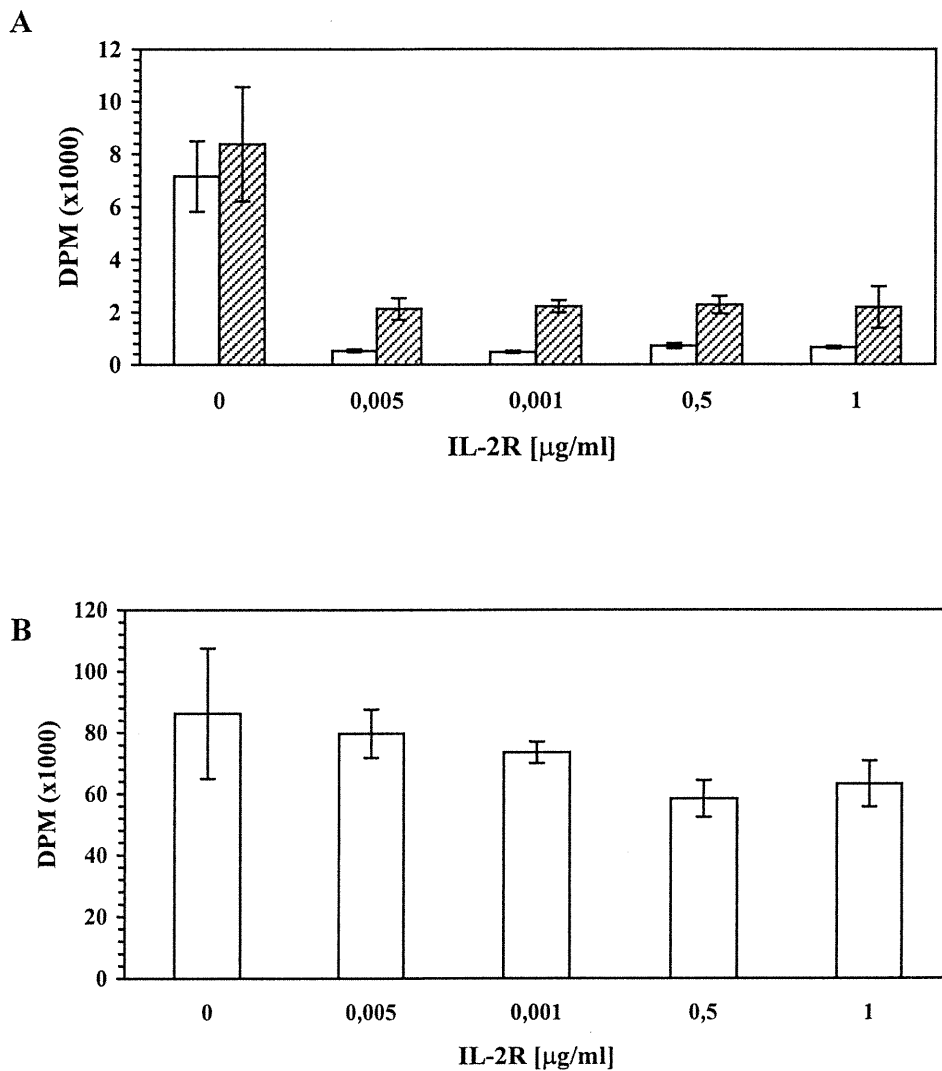
Concentration of IL-6 (A) and IL-2R (B) were determined at different days following burn injury by biological assay or by ELISA, respectively. Results from patients receiving a normal diet including 30% lipids (triangle) as energy source or low fat diet composed 15% of n-3 lipids (square) or n-6 lipids (round) were presented. The low fat group and normal fat group presented important differences.

**Figure 5.** Soluble IL-2R $\alpha$  inhibits the IL-2 increase in reactive NK cells.



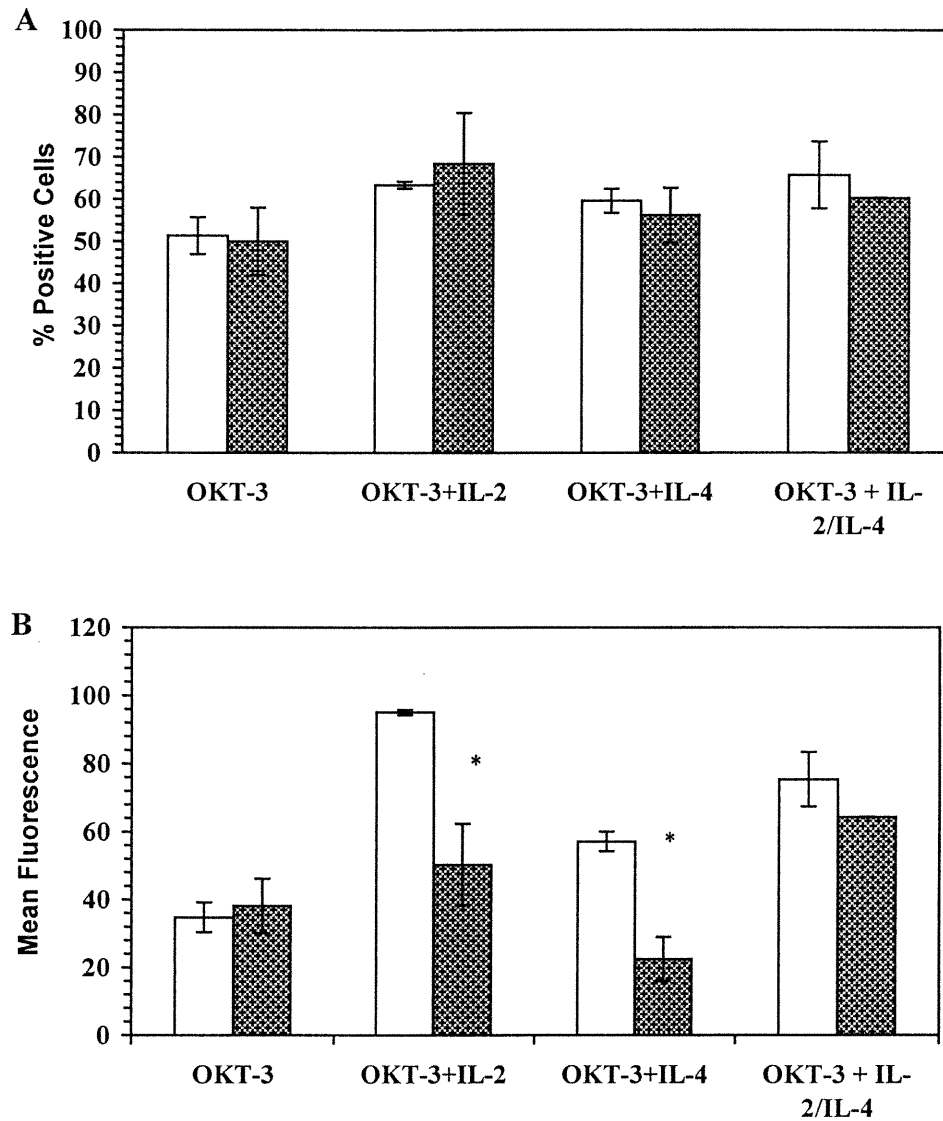
PBMC from healthy volunteers ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were incubated with IL-2 (0 to 100 U/ml) in absence (white bars) or in presence of IL-2R $\alpha$  (crossed bars, 1  $\mu$ g/ml) for 30 min at 37 °C. K562 target cells labelled with DiO were added at effector to yield E:T 40:1, 20:1 and 10:1 and NK functional test were performed. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of % NK activity. The data was taken from five separate studies performed in triplicate. Significant results (\*\* =  $p \leq 0.01$ ) were obtained when the response in presence or absence of sIL-2R $\alpha$  were compared.

**Figure 6.** T cells mitogenic response is not affected by the presence of sIL-2R $\alpha$ .



PBMC from healthy volunteers ( $1 \times 10^5$  cells/well) were incubated in presence of increasing of sIL-2R $\alpha$  concentration. Unstimulated cells (A) or PHA stimulated cells (B,  $1 \mu$ g/ml) were pulsed for 6 h with  $^3$ H-thymidine after 66 h incubation. Results from one of the three independent experiments are presented. Data is the mean of triplicata and is expressed in  $\text{DPM} \pm \text{SEM}$ .

**Figure 7.** Soluble IL-2R cause a defective interferon-gamma production in CD4+ T lymphocytes.



PBMC from healthy volunteers ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were incubated in 24 wells plates coated with OKT-3 in absence (white bars) or in presence of IL-2R (crossed bars,  $1 \mu\text{g/ml}$ ). Twenty four hours later, cells were harvested, washed and incubated in medium alone or supplemented with interleukin (IL-2: 25 U/ml, IL-4  $1 \mu\text{g/ml}$ ) with or without sIL-2R $\alpha$ . Cells were incubated for an additional 24 h and CD4+ T cells were stained for intracellular INF- $\gamma$  protein. Gated CD4+ T cells were analysed for the % positive cells (A) and mean fluorescence value (B) for INF $\gamma$  protein. This experiment is representative of three independent experiments in triplicate. (\* =  $p \leq 0.05$ )



## **CONCLUSIONS**

## 2. CONCLUSIONS DE L'ARTICLE 1

Les résultats de cet article ont montré que les patients brûlés présentent des concentrations plasmatiques élevées du récepteur soluble à l'IL-2 et que la forme soluble présente chez ces patients provient du clivage protéolytique de la partie extracellulaire du récepteur cellulaire. Nous avons également démontré que le rôle de ce récepteur soluble n'est pas de lier et d'inactiver l'IL-2. Toutefois, à de fortes concentrations l'IL-2R $\alpha$  peut entrer en compétition avec le récepteur d'affinité intermédiaire pour se lier à l'IL-2 et, participer indirectement à l'immunosuppression observée après une brûlure. Finalement, l'ensemble des résultats démontre clairement que la présence de l'IL-2R $\alpha$  ne peut expliquer la dysfonction des cellules T des patients brûlés. Toutefois, certaines modifications des paramètres immunitaires peuvent être affectées par la présence de fortes concentrations d'IL-2R $\alpha$ . Par la démonstration d'une corrélation positive entre les taux d'IL-2R $\alpha$  et ceux d'IL-6, nous avons montré, pour la première fois, une relation étroite entre les concentrations d'IL-2R $\alpha$  et la réponse inflammatoire post-brûlure. Enfin, l'originalité de ces travaux a été de montrer qu'une diminution des apports en lipides de la diète (30% vs 15%) est associée à une réduction des concentrations d'IL-2R $\alpha$  concomitantes à celles d'IL-6. La diminution de ces paramètres de l'inflammation est associée à une amélioration des paramètres cliniques et infectieux chez les patients nourris avec une diète faible en lipides. Ainsi, ces résultats laisse supposer que les médiateurs de l'inflammation produits lors de la réponse inflammatoire sont, en partie, responsables de l'immunosuppression sous-jacente à une brûlure sévère.

## **JUSTIFICATIONS**

### 3. JUSTIFICATIONS DE LA DEUXIÈME ÉTUDE

Pour vérifier l'hypothèse voulant que la réponse inflammatoire soit en grande partie responsable de l'immunosuppression nous avons mis au point un modèle animal de brûlure. Pour ce faire, la prolifération *in vitro* des splénocytes et plusieurs paramètres du stress oxydatif (thiols totaux, potentiel mitochondrial et concentrations des MDA dans le foie) secondaires à une lésion thermique ont été évalués chez deux souches différentes de souris : une souche congénique résistante à l'inflammation induite par la LPS et une souche mère possédant une réponse normale à l'inflammation.

**IV. ARTICLE 2**

## **Increased burn-induced immunosuppression in LPS-resistant mice**

N. Jobin<sup>1</sup>, D.R. Garrel<sup>1</sup>, J. Bernier<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) - Hôtel-Dieu, Centre des grands brûlés, Montréal, PQ, Canada and <sup>2</sup>INRS Armand Frappier Institute, Centre de recherche en santé humaine, Pointe-Claire, PQ, Canada

Key words: burns, endotoxin, immunosuppression, oxidative stress

Short running head title: Inflammatory response to burn injury

**Référence :** Cellular Immunology 200, 65-75, 2000

### Abstract

Severe burns induce a state of immunosuppression, and the inflammatory response after burn injury may play a role in this phenomenon. **Objective:** This study examined the effect of the inflammatory response to endotoxin on burn-induced immunosuppression and oxidative stress. **Methods:** An endotoxin-resistant mouse strain (C3H/HeJ) and a normally-responding strain (C3H/HeN) were compared. The mice were separated into 3 groups of 5 animals for each experimental day: 1) saline, 2) buprenorphine, 3) buprenorphine and 20% total body surface area burn. All animals were fed *ad libitum*. The inflammatory response was studied at 1, 4, 7, 10 and 14 days post-burn. **Results:** Proliferation of activated splenocytes in burn mice was significantly lower on days 7, 10 and 14 for the C3H/HeJ strain and on days 4 and 10 for C3H/HeN. Globally, C3H/HeJ presented stronger immune suppression than C3H/HeN. Oxidative stress parameters (liver malonaldehyde, spleen metabolic activity, and thiol concentrations) were higher in endotoxin-resistant mice compared to the control strain. **Summary:** Impairment of the inflammatory response was more pronounced and oxidative stress was greater in endotoxin-resistant burn mice compared to normal burn controls. Buprenorphine administration was not related to depression of these immune parameters. **Conclusion:** The inflammatory response following burn injury may be beneficial to the immune system.

## Introduction

The most frequent complications of severe burn injuries are related to the immune system and the inflammatory response to tissue damage and infection (1). After burn injuries, a state of immunosuppression occurs (2,3). The intensity and duration of this phenomenon are associated with morbidity and mortality in burn patients (1-3). The precise mechanisms underlying this prolonged impairment have not been fully elucidated, although a variety of endogenous mediators have been shown to be correlated with burn-induced immunodepression (1,3-6). Hyperproduction of inflammatory cytokines and overstimulation of immune cells during the inflammatory response are potential mechanisms of immunosuppression (3,7).

Lipopolysaccharide (LPS), an endotoxin derived from the cell wall of gram-negative bacteria, is the most potent known stimulus of the inflammatory cascade (production of tumor necrosis factor or TNF and interleukin-1 or IL-1) (1). Increased levels of circulating endotoxins due to bacterial translocation have been found after acute thermal injury (3,8-10). Elevated endotoxin values are associated with impairment of cellular and humoral functions where both T-cell and B-cell functions are affected (10). Moreover, thermal injury as well as endotoxin administration induce the production of arachidonic acid metabolites, which are strong endogenous immune suppressants (11-13). Proinflammatory cytokines and endotoxins evoke cellular damage that leads to the production of free radicals and causes significant oxidative stress that could mediate further immunosuppression (14-16).

The present study explored the role of the LPS-mediated inflammatory response in immunosuppression and oxidative parameters in an animal burn model. To achieve this goal, we used 2 different mice strains : one responding normally to LPS (C3H/HeN), and the other an endotoxin-resistant strain (C3H/HeJ). The LPS-resistant mouse has proven to be a powerful model for investigations into the basic mechanisms of endotoxicity (17). Its resistance to LPS is attributed to a single mutation in an autosomal gene mapped to a region close to the middle of the 4<sup>th</sup> chromosome (18-20). HeJ mice



are hyporesponsive to the immunostimulatory and pathophysiological effects of lipid A, a component of endotoxin-LPS. This is manifested by their requirement for nearly 100-fold larger amounts of intravenously-administered endotoxin to induce lethality and by the hyporesponsiveness of their macrophages to *in vitro* stimulation of IL-1 and TNF release after exposure to endotoxin (21). C3H/HeJ B-cells and macrophages are intrinsically unresponsive to the cytotoxic effect of LPS (21-23). C3H/HeJ lymphocytes respond normally to T-cell mitogens as well as T-dependent and T-independent antigens other than LPS (24). Inflammatory cytokines and prostaglandins stimulated by LPS in responder cells are not induced in C3H/HeJ macrophages (21).

In accordance with the animal protection protocols of our institution, pain was treated with opioids after burn injury. Since pain is associated with immunosuppression (4,25), the use of an opioid such as buprenorphine gave us the opportunity to evaluate the importance of this factor.

## Materials and methods

### Animals

All experiments were performed on 2 strains of 7-week-old female mice: C3H/HeN (Charles River, Montreal, Quebec, Canada) served as controls or the normally-responding strain, and C3H/HeJ (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) as the endotoxin-resistant strain. Seventy-five animals of both strains were used in this study. The mice were acclimatized for a period of 1 week prior to the initiation of any procedures and were housed in a central animal facility under strictly controlled temperature, relative humidity and a 12-hour light/dark cycle. They were kept in cages each containing 5 mice. Standard chow (Richmond standard diet, Lab Diet, Richmond, IN) and water were provided *ad libitum*. The Institutional Animal Care Committee reviewed and approved all procedures performed in accordance with Canadian Council on Animal Care guidelines.

### **Alzet micro-osmotic pump**

Alzet micro-osmotic pumps (Alza Corporation, Palo Alto, CA) deliver solutions continuously for 3 or 7 days without the need for external connections or frequent handling of animals. On the experimental days, the mice were anesthetized by intraperitoneal (ip) injection of 0.1 ml/10 g weight of a saline solution containing 13.3 mg/ml ketamine (MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario, Canada) and 1.3 mg/ml xylazine (Bayer, Etobicoke, Ontario, Canada) after which the entire dorsal surface and upper sternal region were shaved. An incision was made in the upper sternal skin, and Alzet micro-osmotic pumps were inserted subcutaneously (sc) in the peritoneal cavity. Surgical sutures were used to close the wound. All animals survived these procedures. The pumps deliver 0.1 mg/kg of buprenorphine (Reckitt and Coleman Pharmaceuticals, Richmond, VA) per 12 h. For a 20 g mouse that is the equivalent of 2.0  $\mu\text{g}$  /12 h of buprenorphine. To ensure continuous analgesia in the mice killed on days 10 and 14 post-injury, the pumps were replaced on day 7. For this manipulation, the animals were anesthetized with Enflurane gas (Abbott, Dorval, Quebec, Canada).

### **Experimental thermal injury**

The animals of both strains were randomized into 3 groups of 25 mice as follows: 1. saline-filled Alzet micro-pumps, 2. buprenorphine-filled pumps, and 3. buprenorphine-filled pumps with burn injury. After anesthesia and the insertion of Alzet micro-pumps, the animals were placed in a custom-insulated mould which exposed 20% of their total body surface area (TBSA) on the dorsal aspect. The mould containing the anesthetized animal was immersed in water of either room temperature (22°C) for sham burn or in 90°C water for 6 sec to produce a full-thickness burn. All animals received a 2-ml ip injection of 0.9% saline for fluid resuscitation. Their cages were placed on a 37°C-heated platform for 2 h before they were returned to their regular environment. The animals and their food were weighed daily, and a topical antibacterial agent (Silver Sulfadiazin Cream, Smith and Nephew, Lachine, Quebec, Canada) was applied on the burned areas. Daily macroscopic examination showed no evidence of infection. All mice survived the surgery and thermal injury. Burned animals moved, ate and drank normally throughout the observation period.

### **Sacrifice and organ preparation**

Five animals per group were anesthetized with Enflurane and killed by cardiac puncture as well as cervical dislocation 1, 4, 7, 10 or 14 days after experimentation. Their spleens were removed aseptically and prepared immediately for study. The livers were frozen immediately in liquid nitrogen after dissection and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the assay was performed.

### **Preparation of spleen cell suspensions**

Spleens were removed aseptically and prepared individually as single-cell suspensions with 3 ml of Hank's balanced solution (HBSS, Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada). Splenocyte suspensions were obtained by teasing apart the splenic matrix. The suspensions were washed three times in HBSS containing antibiotics (100 IU/ml penicillin and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin) (Medicorp Inc., Montreal, Quebec, Canada), and red blood cells were removed with lysis buffer (Gey's solution with  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). The cells were resuspended in RPMI 1640 media (Gibco BRL) supplemented with 50  $\mu\text{M}$  2-mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, MO), 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco BRL) and antibiotic solution. Cell viability was determined by trypan blue exclusion and was consistently greater than 90%. The cells were adjusted to a desired concentration in complete RPMI.

### **Proliferative response assay**

Spleen cell cultures were produced in triplicate, in 96-well, flat-bottom tissue culture plates (Falcon, Becton-Dickinson, Lincoln Park, NJ) at  $2 \times 10^5$  viable cells/well. Splenocytes were stimulated with 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Concanavalin (Con-A) (Sigma) or with coated anti-TcR mAb H-57-597 (H-57) (obtained from Dr. Patrice Hugo, Institut de recherche de clinique de Montreal, Montreal, Quebec, Canada). The plates were coated with 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-TcR antibody. After 66 h of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere with 5%  $\text{CO}_2$ , the cultures were pulsed for 6 h with 0.5  $\mu\text{Ci}/\text{well}$  of  $[\text{H}^3]\text{TdR}$  (52.0 Ci/mmol, Amersham Canada, Oakville, Ontario, Canada).  $[\text{H}^3]$ -thymidine incorporation was used as an index of cell proliferation and was measured by liquid scintillation counting. The results are presented as counts per minute (cpm).

### **Liver malonaldehyde (MDA) determination**

On the day of measurement, liver sections were thawed and washed with cold 0.9% saline. The samples were maintained on ice throughout the experiment to avoid *de novo* oxidation. Tissue was weighed and homogenized for 2 min with a Polytron homogenizer. The homogenates were centrifuged at 4,000 rpm at 4°C for 10 min. MDA was measured by colorimetric assay (R&D Bioassay, Minneapolis, MN) of liver homogenate supernatants. This assay is based on the reaction of a chromogenic reagent with MDA at 45°C. Samples were analyzed according to the manufacturer's instructions and were run in duplicate. Absorbance at 586 nm was determined in an automated spectrophotometer (Powerwave, Bio-Tek Instruments, Inc.). The minimal MDA concentration that can be measured in this assay is 0.1 nmol/mL. MDA was quantified on days 4, 10 and 14 in both strains.

### **Flow cytometry**

#### **Immunophenotyping**

Cells were analyzed by 3-color flow cytometry with FACScan<sup>®</sup> (Becton-Dickinson). Splenocytes ( $10^6$  cells \ 100  $\mu$ l) were incubated for 30 min on ice in the presence of fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies: rat anti-mouse anti-CD4 FITC-labeled molecule (H129.19) (Sigma), rat anti-mouse anti-CD8 (53-6.7) conjugated to R Phycoerythrin (Sigma), and rat anti-mouse anti-CD3 labeled RED 670 (29B Quantum Red) (Sigma). The cells were then washed twice with cold PBS and analyzed. Lyse software was used for the analysis.

#### **Measurements of thiol concentrations**

To measure total spleen thiols, we used a 5-chloromethylfluorescein-diacetate (CMFDA) (Molecular probe, ...), a thiol-reactive fluorescent dye which is stable and which can differentiate cellular low molecular weight thiol (26). With this probe, thiol concentrations reflect low molecular weight sulfhydryls, of which glutathione is the most prevalent. For this experiment, the splenocyte suspensions were adjusted at a concentration of  $5 \times 10^6$  cells/ml. The CMFDA probe (5  $\mu$ M) was added to a solution of cells and HBSS supplemented with 0.1% bovine serum albumin (Fraction V, USB,

Cleveland, OH) at pH 7.3. The thiol dye attains maximal staining after 10 min at 37°C. Luminescent signals were recorded by flow cytometry with FACScan®.

#### **Measurement of mitochondrial potential of spleen cells**

Mitochondrial inner transmembrane potential was detected by rhodamine 123, a vital fluorescent dye used in flow cytometry (27). As it is specifically concentrated in mitochondria because of the transmembrane potential that these organelles maintain in living cells, rhodamine 123 is a useful probe to monitor mitochondrial activity. Splenocyte suspensions prepared for proliferation assay were employed and adjusted to a concentration of  $5 \times 10^6$  cells/ml. For this experiment, rhodamine 123 (10  $\mu$ M) was added to a solution of cells and HBSS supplemented with 0.1% bovine serum albumin at pH 7.3, then incubated for 30 min at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. The samples were analyzed immediately by flow cytometry. Propidium iodide- marked cells (dead cells) were excluded by live gating, and the green fluorescence of living cells was restricted to the mitochondria.

#### **Statistical analyses**

Wilcoxon-Mann-Whitney bilateral tests were used to analyze our results. In the first analysis, we compared the buprenorphine group to the saline group to observe the effect of the opioid. Then, we compared the burn group to the buprenorphine group to isolate the burn effect from buprenorphine. The level of confidence was placed at 95% for all experiments.

### **Results**

#### **Chow intake and weight gain**

To assess the possible effects of suboptimal nutrition and impaired animal growth on the immune parameters studied, chow intake and body weight were measured daily. Table 1 reports the cumulative chow intake for each group during the experimental days. Consumption was calculated as mean consumption per cage. Since five mice were housed in each cage, total consumption was quantitated by weighing the chow daily.

The results are representative of 2 independent experiments. They demonstrated that in both strains, surgical manipulation (insertion of the pumps) and 20% TBSA experimental burn injury did not decrease chow intake by these mice. Burned animals of both strains increased their food consumption compared to the buprenorphine group at days 7, 10 and 14: 51%, 29%, 32% and 9%, 11%, 41% for the resistant and control strains, respectively.

Total weight gain was calculated by the difference between weight on the day of sacrifice versus weight on the experimental day. All animal weights were adjusted, considering the weight of the pumps and the quantity of saline or buprenorphine delivered each day. Table 2 shows that buprenorphine administration did not have a negative influence on weight gain in mice of both strains when compared to the saline group. There were weight fluctuations between days and between groups of both strains. This observation was attributed to inter-assay variations. Despite these variations, a similar pattern of weight gain was seen in burned mice on experimental days 1 and 10: 1) the weight change in the burn group was significantly greater when compared to the buprenorphine group 24 h post-burn injury; 2) 10 days after burn injury in both strains, mice receiving a burn displayed significant weight loss compared to the buprenorphine group. However the C3H/HeJ burned and buprenorphine groups, showed significantly weight gain on day 14 when compared to the saline group.

### **Splenocyte proliferation response**

One of the major effects of thermal injury is impairment of the T-cell-mediated response. We studied splenocyte proliferation after stimulation with either Con-A or anti-TcR antibody (H-57). For each experimental day, the results represent the mean value of cell proliferation measured in triplicate for each group animal (n=5). To isolate the buprenorphine effect from the burn injury effect, the data are presented in Figure, in terms of the proliferation ratio, for Con-A-activated splenocytes, and in Figure 2 for the stimulated response to the mitogenic H-57 mAb. The proliferation ratio was calculated as follows: buprenorphine: cpm of mice receiving buprenorphine was divided by the cpm of the controls; burn injury: the cpm of burned mice was divided by the cpm of

mice which received buprenorphine. Typically, mean thymidine incorporation in splenocytes from saline C3H/HeN mice was 79,000 cpm and 99,000 cpm with Con-A and H-57 stimulation respectively, while in C3H/HeJ mice, it was 32,000 cpm and 30,000 cpm with Con-A and H-57-stimulated cells respectively. Under both stimulation conditions, cell proliferation in the buprenorphine group was increased or equal to saline group values, as demonstrated by ratios superior or equal to 1. These results revealed that in our model, buprenorphine administration does not have an immunosuppressive effect on splenocyte proliferation.

Con-A-stimulated splenocytes (Fig. 1) 4 days after injury presented 46% inhibition ( $\Delta$  cpm: -56,813) in the response of burned C3H/HeN mice while on the same day, burned C3H/HeJ mice exhibited 4.7-fold stimulation ( $\Delta$  cpm: +13,115) of proliferation. However, proliferation in the latter strain was suppressed by 69% ( $\Delta$  cpm: -59,171) and 42% ( $\Delta$  cpm: -9,838) on days 10 and 14 respectively after injury whereas the normally-responding strain showed no significant inhibition from days 7 to 14. Nevertheless, significant stimulation (142%) ( $\Delta$  cpm: +28,250) was noted in C3H/HeN mice on day 14. As documented in Figure 2, the inhibitory response was more pronounced when we stimulated the cells with H-57. C3H/HeJ cells demonstrated persistently strong inhibition from day 7 until day 14: the proliferative response of spleen cells from burned animals was depressed by 90% ( $\Delta$  cpm: -30,660), 98% ( $\Delta$  cpm: -81,307) and 91% ( $\Delta$  cpm: -21,468) relative to the buprenorphine controls on days 7, 10 and 14 respectively. In the C3H/HeN strain, the proliferative response showed 32% ( $\Delta$  cpm: -32,119) suppression on day 4 and 93% ( $\Delta$  cpm: -128,674) on day 10.

### **Immunophenotyping**

Burn injury is associated with a change in cell populations that may be partially responsible for immunosuppression (28). Table 3 reports on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in the CD3<sup>+</sup> splenocyte population in mice of both strains for each experimental day. Burned C3H/HeN and C3H/HeJ animals presented a significant decrease of CD4 and CD8 subsets in lymphocyte-gated cells from day 4 until the end of the study, compared to the buprenorphine group. B cells also were decreased on the same days (data not shown).

However, the ratio between suppressor/cytotoxic and helper/inducer subsets remained unchanged with the exception of day 7 for both strains and day 14 in the normally-responding strain in which it was elevated. The absence of change in the ratio supposes that CD4 and CD8 were decreased proportionally after burn injury.

### **Oxidative stress parameters**

Oxidative stress induced by burn injury could play a role in decreasing immune functions. To address this question, we studied 3 parameters of oxidative stress in both strains.

#### **MDA concentrations**

Measurement of the liver end product of lipid peroxidation provided information on hepatic oxidative metabolism in both strains after burn injury. MDA concentrations in the liver are reported in Figure 3. On day 10 in C3H/HeJ mice, burn injury induced a 42% increase of MDA concentration compared to the buprenorphine group ( $p < 0.01$ ). The normally-responding strain showed no difference in liver MDA values between groups.

#### **Metabolic activity**

Figure 4 depicts the metabolic activity of splenocytes by rhodamine 123 staining. In C3H/HeN, we found a 27% increase of splenocyte metabolic activity in burned animals compared to the buprenorphine group, 4 days after burn injury ( $p < 0.05$ ). In this same strain, the buprenorphine group, compared to saline, presented a decrease of metabolic activity on day 14 ( $p < 0.01$ ). In contrast, the C3H/HeJ strain exhibited a time-related elevation of mitochondrial activity: Burned animals showed higher activity on days 10 (62%) and 14 (54% more), but inhibition on day 4 after burn injury (35%) ( $p < 0.01$  for all days).

#### **Thiol concentrations**

To establish an index of oxidative stress in splenocytes, thiol concentration was measured with the CMFDA probe as shown in Figure 5. We observed that thiol



concentrations increased consistently in burned C3H/HeJ mice from day 4, while C3H/HeN mice had smaller differences between groups.

### **Discussion**

The data reported here provide new information on the role of LPS sensitivity in burn-induced immunosuppression by showing that endotoxin resistance is associated with more persistent and dramatic T-cell impairment conjugated by higher oxidative stress. From these results, the hypothesis can be advanced that a normal LPS-mediated inflammatory response may not be debilitating to the immune response after burn injury. In addition, we report that the use of buprenorphine for analgesia does not interfere with the study of immune functions in this animal burn model.

Knowing that sub-optimal nutrition has deleterious effects on the immune system (29) and animal growth, food intake and body weight were measured daily. Our results showed that burn injury induced higher food consumption. These results are in agreement with the presence of an hypermetabolic state that occurs generally after thermal injury (1). It appears that by eating more food than the controls (saline- or buprenorphine-filled pumps), burn mice compensate for their higher metabolic rate. These data also demonstrated the absence of malnutrition in this burn/continuous opioid administration model and, consequently, a malnourished state can be ruled out to explain the differences found between burn and control animals. The presence of an hypermetabolic state in our mice was confirmed by the fact that higher food consumption was not associated with weight gain after burn injury. The increase in burn mice weight of both strains observed on day 1 could be explained by edema that generally occurs after burn damage. The significant wasting seen 10 days after burn, which was also reported by Molloy et al. (30) in mice receiving a 20% TBSA burn, could be attributed to the metabolic and immune changes that follow thermal insults. Indeed, we and others (30,31) have noted that the deep immunosuppression induced at 10 days after burn injury is related to maximum impairment of the T-cell proliferation response and, thus, could have implications for animal growth.

Experimental and clinical data suggest immunosuppressive effects of endogenous and exogenous opioids (32,33). Considering the amount of opioids administered to burn populations, these immunosuppressive effects could play a role in the immune dysfunction that follows thermal injury. Our data show that buprenorphine administration does not negatively affect the proliferative capacity of mice splenocytes after 20% TBSA burn injury. It has been demonstrated that buprenorphine does not suppress natural killer activity in rodents when administered up to 5 times the analgesic equivalent of morphine (34). Here, continuous buprenorphine delivery did not affect splenocyte proliferation, suggesting that continuous analgesia can be used without interfering with immune functions in a burn injury model.

Several studies have shown that T-cell functions are markedly compromised, both in burn patients and in experimental animals (35-38). Despite these data, the mechanisms of burn-induced immunosuppression are not clearly understood. To measure splenocyte activity, we investigated the proliferative response induced by Con-A, a polyclonal stimulus involving macrophages, B- and T-cells. To further study the T-cell response, we also stimulated the cells with H-57, a more specific stimulus involving the TcR-mediated response. With this T-cell mitogen, accessory cells provide help only as passive co-stimulators through macrophages and B-cells via B-7 (CD80) antigen interaction with the T-cell CD28 molecule (39). Globally, as revealed by the H-57 mitogen, the results of the proliferative response confirmed that the state of immunosuppression after burn injury affected all lymphocytes but mainly the T-cell population (35-38). Moreover, we observed inhibition of the spleen cell proliferation responses to a B-cell mitogen, LPS, in burned mice of both strains (data not shown). As we expected, the LPS response of endotoxin-resistant mice was significantly lower than that of the normally-responding strain (100,000 cpm and 2,100 cpm for C3H/HeN and C3H/HeJ respectively). These results confirmed the LPS resistance of C3H/HeJ mice.

Normally-responding mice present biphasic depression of spleen cell proliferation responses to mitogens (Con-A and H-57) between postburn days 4 and 10. Other groups

have also reported, in rats, 2 peaks of immunosuppression that occur 4 and 10 days after burn injury (40,41). Nevertheless, as demonstrated with H-57-stimulated cells, our results, which are in accordance with those of others (30,31), revealed that 10 days post-burn corresponds with the point of maximum impairment of T-cell proliferative responses and consequently with maximum susceptibility to infection. Many mechanisms and hypothesis have been proposed to explain this immunosuppression state: a decrease in IL-2 production (30,31,36-38,41-43), an increase in macrophage activity which leads to an augmentation of nitric oxide (NO) and prostaglandin synthesis (40,41), a reduction of GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) activity (30), and a shift in T<sub>H</sub>2-dominated phenotype (41,44). Although this suppression occurred until day 10, the stimulated splenocyte response of C3H/HeN mice was heightened by 14 days post-burn. These results were also obtained by others, some of whom attributed this rebound increase by day 14 to a gradual return to the normal ratio between suppressor/cytotoxic and helper/inducer subsets (42,45). In fact, in the normally-responding strain, we observed a rise in the CD4/CD8 ratio on day 14. On other days of the experiment, despite the decrease in CD4 and CD8 subsets after burn injury, the ratios (CD4/CD8) were not different from those of other groups. Also it must be noted that the decrease in CD4 and CD8 did not always correspond to a decline of the proliferative response. Consequently, the change in cell populations could not explain the immunosuppression that followed burn injury.

In contrast to the normally-responding strain, endotoxin-resistant mice manifested a significant elevation of Con-A-activated splenocytes on day 4. Con-A is a polyclonal mitogen that binds to the terminal D-mannose of glycolipid which is expressed on T- and B-lymphocytes as well as macrophages. Although Con-A is not a mitogenic agent for B-cells and macrophages, we can not exclude the possibility that it activates the production of cytokines on cell surface molecules, which can modulates the T-cell response (46). Recent results have demonstrated that macrophage activity contributes to the suppression of T-lymphocyte function after thermal injury (47,48). This hyperactivation of macrophages that leads to hyperproduction of immunosuppressive factors (prostaglandins<sup>E2</sup>, NO, etc.), would explain the impressive suppression of H-57-

activated T-cells. Also, in contrast to the normally responding strain, the resistant strain presented an inhibited response until 14 days post-burn injury. This strong immunosuppression may be related to the lower capacity of C3H/HeJ mice cells to produce  $\text{INF}\gamma$  (interferon  $\gamma$ ) (17). It is known that the cytokine environment during early T-cell activation can determine the dominant cytokine profile of the T-cell response.  $\text{T}_{\text{H}2}$  cells release 2 key mediators, IL-4 and IL-10, which, while important in elaboration of the humoral response, also have immunosuppressive effects on cell-mediated responses (49). Recent studies have shown that major burns induce a shift in the cytokine response to a predominantly immunosuppressive  $\text{T}_{\text{H}2}$  phenotype, revealed by a decrease in the production of IL-2 and  $\text{INF}\gamma$  and by an increase of IL-4 and IL-10 (42,44). Thus, it is possible that burn injury exacerbates  $\text{INF}$  production in HeJ mice, in which it is already low, making it favorable to the  $\text{T}_{\text{H}2}$  switch. Although it remains to be confirmed, overproduction IL-10 could be implicated in the immunosuppressive effect in the C3H/HeJ strain, as demonstrated in other models (50). On the other hand, we have recently reported the presence of the soluble form of IL-2 receptor alpha in the serum of burn patients (51). Interestingly, we also observed a diminution at the cellular level in the production of  $\text{INF}\gamma$  in the presence of soluble IL-2 receptor alpha (51).

The immunosuppression that follows burn injury is generally attributed to several factors, such as the inflammatory response, oxidative stress or over-stimulation of the immune response by endogenous antigens (37,38). To address this question, we examined oxidative stress in both mice strains via measurements of MDA, the liver end product of lipid peroxidation. These findings informed us about the involvement of endotoxin-inflammatory sensitivity in oxidative metabolism of the liver after burn injury. Accumulation of hepatic conjugated dienes has been shown to have a significant correlation with inflammatory gene activation (52).

Burn injury leads to both oxygen radical-induced cell dysfunction and impaired cellular energetics (52). The degree of oxidant injury is dependent on the oxidant involved and the balance between oxidants released and antioxidant activity (53). Water-soluble antioxidants given after burn injury have been found to prevent alterations in cell

energetics (52). Oxidant release after burn appears to persist as long as the inflammatory response persists (53,54). Lalonde et al. (52) have demonstrated, in a sheep model, an elevation of liver MDA, a decrease of catalase activity for at least 3 days after burn and high conjugated diene levels until day 14 in burn patients (54). In the present study, however, we observed no increase of lipid peroxidation products 4, 10 and 14 days after burn injury in the normally-responding strain. The half-life of MDA being only several h (55), its absence 4 days after injury supposes that antioxidant activity counterbalances burn-induced oxidation. This explanation is supported by the significant increase of liver thiol concentrations found on the same day (day 4) in our animal model. The probe used for thiol measurements represents esterase activity in cells and is able to conjugate low molecular weight sulfhydryls, among which glutathione is the most abundant, thereby producing a fluorescent product. The increase in total thiols could be due either to a rise in esterase activity and/or an augmentation of glutathione concentrations. However, in endotoxin-resistant mice, we observed an elevated level of MDA 10 days after burn injury. It is interesting to see this increase in oxidation, despite the heightened levels of thiols found until 10 days after the burn injury. It appears that in these mice, antioxidant activity is not enough to attenuate liver peroxidation but is sufficient to prevent a fatal outcome. This increase in oxidative stress may represent an alternative inflammatory pathway used by cells in the absence of the endotoxin pathway. The difference in the level of oxidation between the 2 strains could be related to the activation of macrophages (54).

Oxidative stress triggers several types of cellular responses to decrease the severity of this effect. Therefore, we wanted to look at metabolic changes in splenocytes. Rhodamine is an index associated with increased metabolic activity of cells. MDA elevation and rhodamine 123 staining suggest a rise in the metabolic activity of splenocytes, which can result from inflammatory response activation. The latter might be augmented by oxidative stress. Taken together, changes in oxidative defense parameters indicate that increased thiol levels are associated with heightened defense occurring against oxidative stress in HeJ mice after burn injury. Augmented oxidative stress can partially explain the immunosuppression observed in endotoxin-resistant mice

after thermal injury since this phenomenon is linked with augmented apoptosis and the production of proinflammatory cytokines, particularly by macrophages.

Our study shows that a weak endotoxin inflammatory response is associated with more pronounced immunosuppression and oxidative stress in burn mice. By bypassing the endotoxin-mediated inflammatory response, it appears that there is a significant increase in the activation of scattered cells reflected by the level of oxidative stress, and this hyperactivation leads to profound anergy of T-cells after burn injury. This in vivo model suggests that the normal LPS-mediated inflammatory response may be an important pathway for the immune system to exert its anti-infection functions after thermal stress.

### References

1. Harris, B. H., and Gelfand, J. A., The immune response to trauma. *Sem. Pediatr. Surg.* **4**, 77-82, 1995.
2. Moran, K., and Munster, A. M., Alterations of the host defense mechanism in burned patients. *Surg. Clin. North Am.* **67**, 47-55, 1987.
3. Allgöwer, M., Schoenenberger, G. A., and Sparkes, B. G., Burning the largest organ. *Burn* **21**(suppl. 1), S7-S47, 1995.
4. Baumann, H., and Gauldie, J. The acute phase response. *Immunology Today* **15**, 74-80, 1994.
5. Donnelly, T. J., Meade, P., Jagels, M., et al., Cytokine, complement, and endotoxin profiles associated with the development of the adult respiratory distress syndrome after severe injury. *Crit. Care Med.* **22**, 768-776, 1994.
6. Molloy, R. G., Mannick, J. A., and Rodrick, M. L. Cytokines, sepsis and immunomodulation. *Br. J. Surg.* **80**, 289-297, 1993.
7. Rodriguez, M. D., Miller, C. G., Garner, W. L., et al., Correlation of the local and systemic cytokine response with clinical outcome following thermal injury. *J. Trauma.* **4**, 684-694, 1993.
8. Cardis, D. T., Reinhold, R. B., Woodruff, P. W. H., and Fine, J., Endotoxemia in man. *Lancet* **1**, 1381-1385, 1972.
9. Cuevas, P., Ishiyama, M., Koizumi, S., et al., Role of endotoxemia of intestinal origin in early death from large burns. *Surg. Gynecol. Obstet.* **138**, 725-730, 1974.
10. Winchurch, R. A., Thupari, J. N., and Munster, A. M. Endotoemia in burn patients: levels of circulating endotoxins are related to burn size. *Surgery* **102**, 808-812, 1987.
11. Antonacci, A. C., Calvano, S. E., Reaves, R. E., et al., Autologous and allogeneic mixed-lymphocyte responses following thermal injury in man: the immunomodulatory effects of interleukin 1, interleukin 2, and a prostaglandin inhibitor, WY-18251. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **30**, 304-320, 1984.
12. Ninnemann, J. L., and Stockland, A. E., Participation of prostaglandin E in immunosuppression following thermal injury. *J. Trauma* **24**, 201-207, 1984.

13. Surette, M. E., Dallaire, N., Jean, N., Picard, S., and Borgeat, P., Mechanisms of the priming effect of lipopolysaccharides on the biosynthesis of leukotriene B4 in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils. *FASEB J.* **12**, 1521-1531, 1998.
14. Geller, D. A., Freeswick, P. D., Nguyen, D., Nussler, A. K., Di Silvio, M., Shapiro, R. A., Wang, S. C., Simmons, R. L., and Billiar, T. R., Differential induction of nitric synthase in hepatocytes during endotoxemia and the acute-phase response. *Arch, Surg.* **129**, 165-171, 1994.
15. Tunçtan, B., Uludag, O., Altug, S., and Abacioglu, N., Effects of nitric oxide synthase inhibition in lipopolysaccharide sepsis in mice. *Pharmacol. Res.* **38**, 405-411, 1998.
16. Basu, S., and Eriksson, M. Oxidative injury and survival during endotoxemia. *FASEB Lett.* **438**, 159-160, 1998.
17. Vogel, S. N., Moore, R. N., Sipe, J. D., and Rosenstreich, D. L. BCG-induced enhancement of endotoxin sensitivity in C3H / HeJ mice. *J. Immunol.* **124**, 2004-2009, 1980.
18. Glode, L M., and Rosenstreich, D. L., Genetic control of B cell activation by bacterail lipopolysaccharide is mediated by multiple distinct genes or alleles. *J. Immunol.* **117**, 2061-2066, 1976.
19. Watson, J., and Riblet, R., Genetic control of responses to bacterial lipopolysaccharides in mice. I evidence for a single gene that influences mitogenic and immunogenic responses to lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **140**, 1147-1161, 1974.
20. Watson, J., Kelly, K., Largen, M., and Taylor, B. A., The genetic mapping of a defective LPS response gene in C3H/HeJ mice. *J. Immunol.* **120**, 422-424, 1978.
21. Rosenstreich, D. L., Vogel, S. N., Jacques, A. R., Wahl, L. M., and Oppenheim, J. J. Macrophage sensitivity to endotoxins: genetic control by a single codominant gene. *J. Immunol.* **12**, 1664-1670, 1978.
22. Glode, L. M., Jacques, A., Mergenhagen, S. E., and Rosenstreich, D. L., Resistance of macrophages from C3H/HeJ mice to the in vitro cytotoxic effects of endotoxin. *J. Immunol.* **119**, 162-166, 1977.



23. Glode, L. M., Scher, I., Osbourne, B., and Rosenstreich, D. L., Cellular mechanism of endotoxin unresponsiveness in C3H/HeJ mice. *J. Immunol.* **116**, 454-461, 1976.
24. Koenig S., Hoffman, M. K., and Thomas, L., Induction of phenotypic lymphocyte differentiation in LPS unresponsive mice by an LPS-induced serum factor and by lipid A-associated protein. *J. Immunol.* **118**, 1910-1911, 1977.
25. Page, G. G. The medical necessity of adequate pain management. *Pain Forum* **5**, 227-233, 1996.
26. Hedley, D.W., and Chow, S., Evaluation of methods for measuring cellular glutathione content using flow cytometry. *Cytometry* **15**, 349-358, 1994.
27. Chen, L.B., Mitochondrial membrane potential in living cells. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **4**, 155-181, 1988.
28. O'Sullivan, S.I., and O'Connor, T.P.F., Immunosuppression following thermal injury: the pathogenesis of immunodysfunction. *Br. J. Plastic Surg.* **30**, 615-623, 1997.
29. Chandra, R. K., Immunodeficiency in undernutrition and overnutrition. *Nutr. Rev.* **39**, 225-231, 1981.
30. Molloy, R. G., Holzheimer, R., Nestor, M., Collins, K., Mannick, J. A., and Rodrick, M. L., Granulocytes-macrophage colony-stimulating factor modulates immune function and improves survival after experimental thermal injury. *Br. J. Surg.* **82**, 770-776, 1995.
31. Moss, N., Gough, D. B., Jordan, A. L. et al., Temporal correlation of impaired immune response after thermal injury with susceptibility to infection in a murine model. *Surgery* **104**, 882-887, 1988.
32. Weber, R. J., and Pert, A., The periaqueductal gray matter mediates opiate-induced immunosuppression. *Science* **245**, 188-190, 1989.
33. Carr, D. J. J., Rogers, T. J., and Weber, R. J., The relevance of opioid receptors on immunocompetence and immune homeostasis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **213**, 248-257, 1996.
34. Williams, W., Rice, K. C., and Weber, R. J., Nonpeptide opioids: in vivo effects on the immune system. *Natl. Inst. Drug Abuse Res. Monogr. Ser.* **105**, 404-407, 1991.

35. Youn, Y. K., Lalonde, C., and Demlking, R., The role of mediators in the response to thermal injury. *World J. Surg.* **16**, 30-36, 1992.
36. Barlow, Y., T lymphocytes and immunosuppression in the burned patient: a review. *Burns* **20**, 487-490, 1994.
37. Sparkes, B. G., Immunological responses to thermal injury. *Burns* **23**, 106-113, 1997.
38. Faist, E., Schinkel, C., and Simmer, S., Update on the mechanisms of immune suppression of injury and immune modulation. *World J. Surg.* **20**, 454-459, 1996.
39. Jenkins, M.K., Mueller, D., Schwartz, R.H., Carding, S., Bottomley, K., Stadecker, M.J., Urdahl, K.B., Norton, S.D. Induction and maintenance of anergy in mature T cells. *Adv Exp Med Biol.* **292**, 167-176, 1991.
40. Bamberger, T., Masson, I., Mathieu, J., Chauvelot-Moachon, L., Giroud, L. P., and Florentin, I., Nitric oxide mediates the depression of lymphoproliferative responses following burn injury in rats. *Biomed. Pharmacother.* **46**, 495-500, 1992.
41. Masson, I., Mathieu, J., Nolland, X.B., et al. Role of nitric oxide in depressed lymphoproliferative response and altered cytokine production following thermal injury in rats. *Cell. Immunol.* **186**, 121-132, 1998.
42. Hunt, J. P., Hunter, C. T., Browstein, M. R., et al. The effector component of the cytotoxic T-lymphocyte response has a biphasic pattern after burn injury. *J. Surg. Res.* **80**, 243-251, 1998.
43. O'Riordain, D. S., Mendez, M. V., O'Riordain, M. G., et al., Molecular mechanisms of decreased interleukin-2 production after thermal injury. *Surgery* **114**, 407-414, 1993.
44. Zedler, S., Bone, R. C., Baue, A. E., von Donnersmarck, G. H., and Faist, E. T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns. *Crit Care Med.* **27**, 66-72, 1999.
45. Melrvine, A. J., O'Mahony, J. B., Saporoschetz, I., et al., Depressed immune response in burn patients: use of monoclonal antibodies and functional assays to define the role of suppressor cells. *Ann. Surg.* **196**, 297-304, 1982.
46. Ashman, R.S., Lymphocyte Activation in: *Fundamental immunology*. W.E. Paul, Raven Press, 3<sup>rd</sup> ed. 1985.

47. Yang, L., and Hsu, B. The roles of macrophages (M phi) and PGE-2 in postburn immunosuppression. *Burns* **18**,132-136,1992.
48. Schwacha, M.G., and Somers, S.D. Thermal injury-induced immunosuppression in mice: the role of macrophage-derived reactive nitrogen intermediates. *J. Leuk. Biol.* **63**, 51-58, 1998.
49. Parronchi, P., DeCarli, M., Manetti, R., et al., IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. *J. Immunol.* **149**, 2977-2983, 1992.
50. Kelly, J.L., Lyons, A., Soberg, C.C., Mannick, J.A., Lederer, J.A. Anti-interleukin-10 antibody restores burn-induced defects in T-cell function. *Surgery* **122**, 146-152, 1997.
51. Jobin, N., Garrel, D.R., Bernier, J., Increased serum soluble-interleukin-2 receptor in burn patients: characterization and effects on the immune system. *Human immunology*, in press.
52. Lalonde, C., Nayak, U., Hennigan, J., and Demling, R. Antioxidants prevent the cellular deficit produced in response to burn injury. *J. Burn Care Rehab.* **17**, 379-383, 1996.
53. Daryani, R., Lalonde, C, Zhu, D., Weidner, M., Knox, J., and Demling, R. H. Effect of endotoxin and a burn injury on lung and liver lipid peroxidation and catalase activity. *J.Trauma* **30**, 1330-1334, 1990.
54. Nguyen, T. T., Cox, C. S., Traber, D. L., et al. Free radical activity and loss of plasma antioxidants, vitamin E, and sulfhydryl groups in patients with burns: the 1993 Moyer Award. *J. Burn Care Rehabil.* **14**, 602-609, 1993.
55. Marnett, A., Buck, J., Tuttle, M., et al., Distribution and oxidation of malondialdehyde in mice. *Prostaglandins* **30**, 241-254, 1985.

## **TABLES ET GRAPHIQUES**

**Table 1.** Cumulative solid chow intake during 5 days of the experiment

	Day 1 (g)*	Day 4 (g)*	Day 7 (g)*	Day 10 (g)*	Day 14 (g)*
<b>HeN strain:</b>					
Saline (n=25)	11.3	42.6	87.4	121.2	188.4
Buprenorphine (n=25)	10.6	30.6	89.5	127.2	186.3
Burn (n=25)	10.7	43.4	97.5	141.2	265.5
<b>HeJ strain:</b>					
Saline (n=25)	11.7	40.2	55.8	119.6	136.0
Buprenorphine (n=25)	11.6	36.7	60.2	110.1	133.9
Burn (n=25)	11.4	43.2	91.1	142.3	176.7

Results are expressed for the saline group, the buprenorphine group and the burn group of both strains.

- Cumulative chow intakes represent by 5 mice housed in each cage.

**Table 2.** Mean change in weight on days 1, 4, 7, 10 and 14 of the experiment

	Mean $\Delta$ weight (g) <sup>1</sup>				
	Day 1	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14
	sem <sup>2</sup>	sem <sup>2</sup>	sem <sup>2</sup>	sem <sup>2</sup>	sem <sup>2</sup>
<b>HeN strain:</b>					
Saline (n=25)	-1.56	-0.55	-0.94	0.33	0.70
Buprenorphine (n=25)	-0.41	-0.62	-0.14	0.28	0.71
Burn (n=25)	1.00*	0.18*	-0.57	-0.61*	0.49
<b>HeJ strain:</b>					
Saline (n=25)	0.47	-0.75	0.03	-0.19	0.66
Buprenorphine (n=25)	0.44	-0.48	0.24	0.93 <sup>‡</sup>	1.33 <sup>‡</sup>
Burn (n=25)	1.40*	-0.12	-0.08	0.08*	1.28
	sem <sup>2</sup>	sem <sup>2</sup>	sem <sup>2</sup>	sem <sup>2</sup>	sem <sup>2</sup>
	0.42	0.50	0.70	0.92	0.72
	0.50	0.51	1.17	0.56	0.59
	0.69	0.55	0.96	0.89	0.29
	0.19	0.46	0.44	0.63	0.30
	0.26	0.29	0.40	0.51	0.38
	0.39	0.42	0.72	0.73	0.52

<sup>1</sup> Mean  $\Delta$  weight: mean weight on day of sacrifice minus weight on the experimental day.

<sup>2</sup> Each datum represents the standard error of the mean (sem) of 5 animals per group. \* p < 0.05 for the burn group compared to buprenorphine

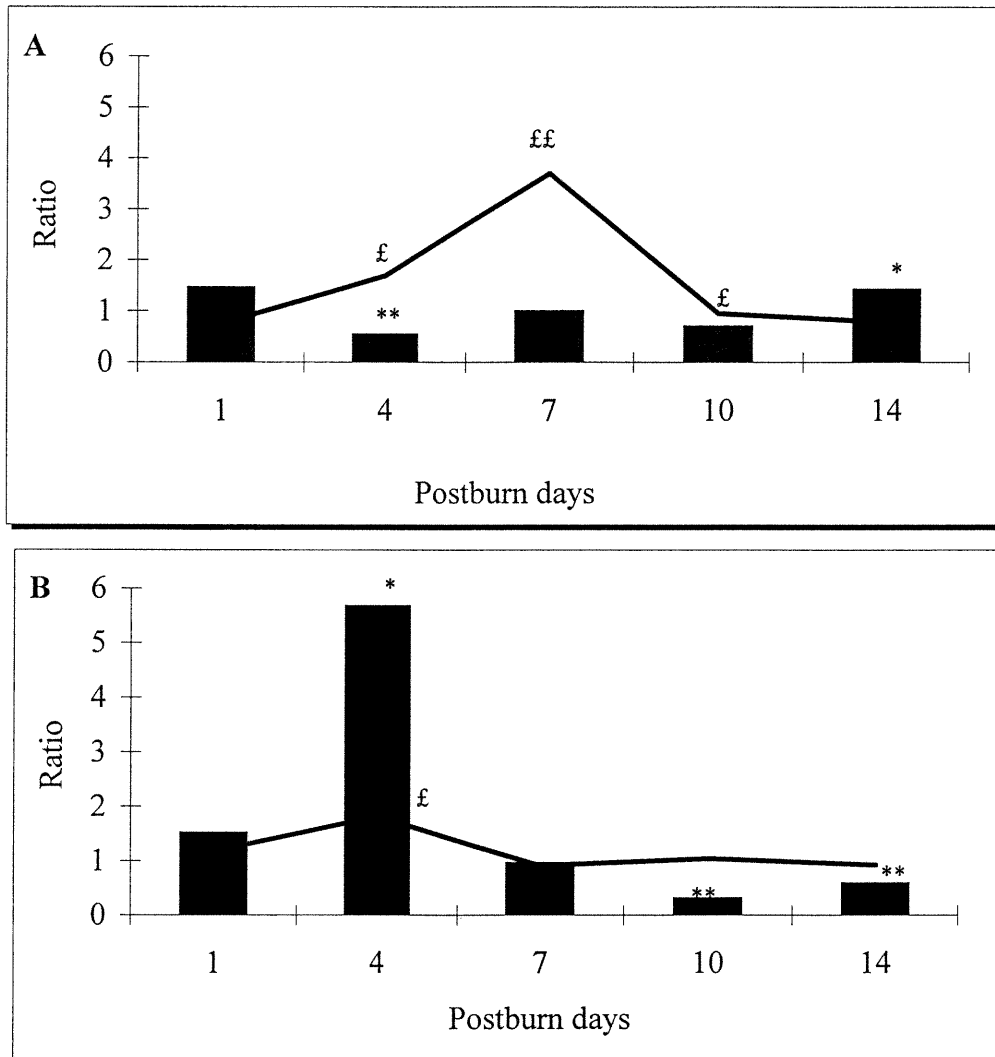
<sup>‡</sup> p < 0.05 for the buprenorphine group compared to saline

Table 3. Spleen analysis of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> population cells after burn injury.

Day	HeN	CD4 (%)	CD8 (%)	CD4/CD8	Day	HeJ	CD4 (%)	CD8 (%)	CD4/CD8
1	Saline	19.2 ± 2.7	8.9 ± 1.6	2.2 ± 0.3	1	Saline	30.7 ± 1.5	21.6 ± 3.3	1.4 ± 0.2
	Bupren.	‡15.8 ± 2.5	‡‡6.2 ± 1.4	2.5 ± 0.5		Bupren.	28.8 ± 6.8	22.8 ± 2.5	1.3 ± 0.4
	Burn	**22.8 ± 3.8	‡‡10.3 ± 1.6	2.2 ± 0.1		Burn	29.3 ± 1.4	21.5 ± 4.4	1.4 ± 0.3
4	Saline	15.1 ± 1.4	6.3 ± 0.5	2.4 ± 0.2	4	Saline	28.7 ± 2.5	16.3 ± 1.0	1.8 ± 0.2
	Bupren.	‡18.2 ± 2.6	7.1 ± 1.0	2.6 ± 0.2		Bupren.	27.2 ± 2.9	15.5 ± 1.9	1.8 ± 0.1
	Burn	*14.2 ± 2.6	**5.4 ± 0.8	2.6 ± 0.3		Burn	**22.0 ± 2.0	**11.8 ± 0.8	1.9 ± 0.1
7	Saline	23.8 ± 1.4	11.1 ± 0.4	2.2 ± 0.1	7	Saline	24.9 ± 6.1	10.4 ± 2.8	2.4 ± 0.1
	Bupren.	22.8 ± 2.8	9.8 ± 1.1	2.3 ± 0.1		Bupren.	22.6 ± 2.0	8.0 ± 1.2	2.8 ± 0.5
	Burn	**18.4 ± 3.7	**6.3 ± 0.6	**2.9 ± 0.3		Burn	**18.4 ± 1.7	*5.4 ± 0.7	**3.4 ± 0.3
10	Saline	23.9 ± 5.0	9.8 ± 1.2	2.4 ± 0.2	10	Saline	26.7 ± 2.0	13.6 ± 1.9	2.0 ± 0.1
	Bupren.	‡17.8 ± 3.1	‡7.4 ± 1.4	2.4 ± 0.3		Bupren.	28.4 ± 0.8	14.5 ± 1.4	2.0 ± 0.2
	Burn	15.6 ± 1.7	7.0 ± 0.5	2.2 ± 0.3		Burn	**17.0 ± 0.7	**7.1 ± 0.8	2.4 ± 0.1
14	Saline	18.0 ± 7.8	7.4 ± 3.8	2.4 ± 0.3	14	Saline	32.7 ± 2.2	16.0 ± 1.9	2.0 ± 0.1
	Bupren.	23.0 ± 2.7	10.3 ± 1.4	2.2 ± 0.2		Bupren.	31.0 ± 3.2	15.9 ± 1.9	2.0 ± 0.2
	Burn	**13.5 ± 1.2	**4.9 ± 0.5	**2.7 ± 0.3		Burn	**19.1 ± 1.7	**11.0 ± 1.6	1.7 ± 0.3

Splenocytes were stained for the expression of CD3, CD4 and CD8. CD3<sup>+</sup> cells were gated in the lymphocyte population and the proportions of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> were determined. Each result was obtained from 5 mice per group and is representative of 2 experiments \* p < 0.05 and \*\*p < 0.01 for the burn group compared to buprenorphin ‡ p < 0.05 and ‡‡ p < 0.01 for the buprenorphine group compared to saline

**Figure 1.** Burn injury causes a more severe decrease of Con-A-stimulated splenocytes in endotoxin-resistant mice.

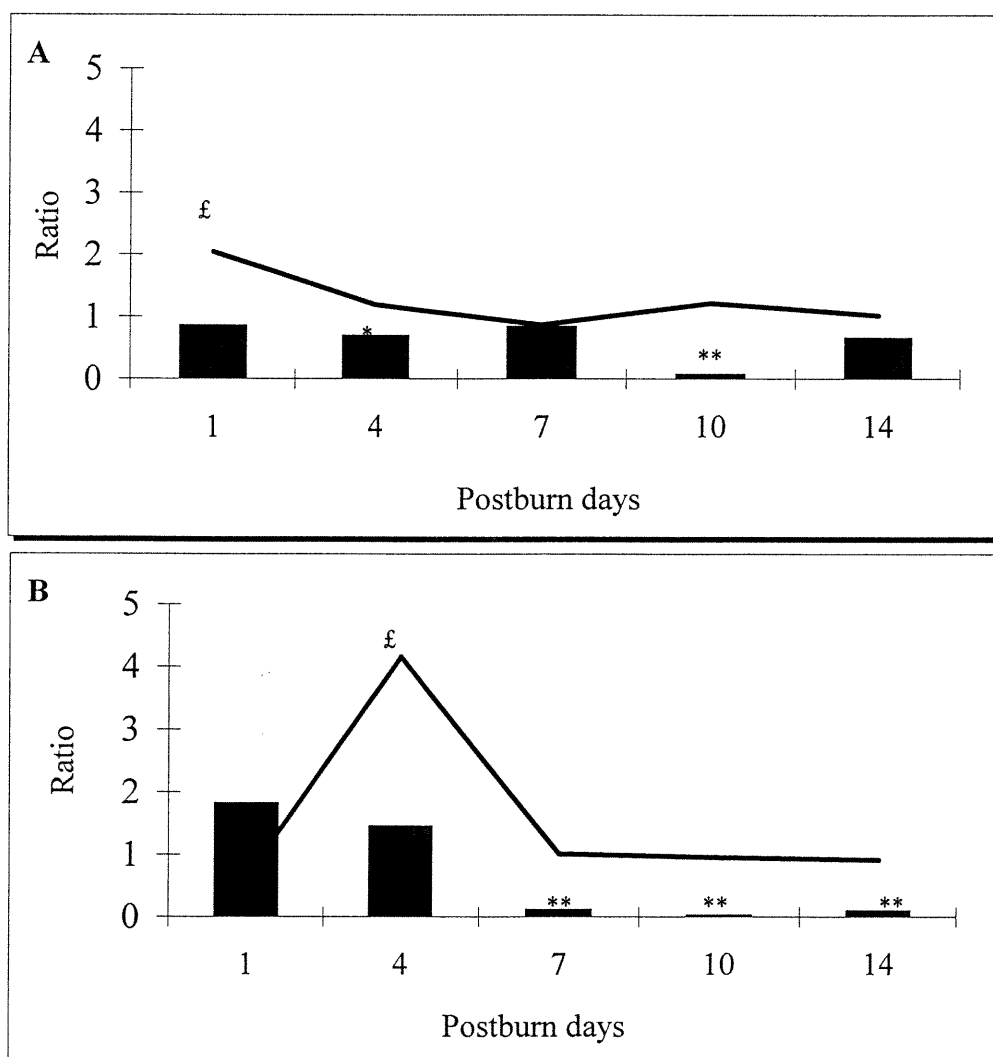


The splenocyte response to Con-A stimulation in the normally-responding (C3H/HeN) (A) and endotoxin-resistant (C3H/HeJ) (B) strains was measured on 1, 4, 7, 10, 14 days post-injury. Proliferative ratios that compare buprenorphine sham-burn mice to saline mice (continuous line) and buprenorphine sham-burn to burned mice (solid bars) are presented. On every experimental day, spleens were collected from 5 mice in each group. Individual mice splenocytes ( $2 \times 10^5$  cells/well) were stimulated in triplicate with Con-A at a final concentration of  $1 \mu\text{g/ml}$ . Plates were incubated under standard conditions for 66 h and pulsed for an additional 6 h with  $[^3\text{H}]$ -thymidine. The results are expressed as mean proliferation in 5 animals per group.

\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  for burn vs buprenorphine-treated mice, £ $p < 0.05$  and ££ $p < 0.01$  for buprenorphine-treated mice vs saline.

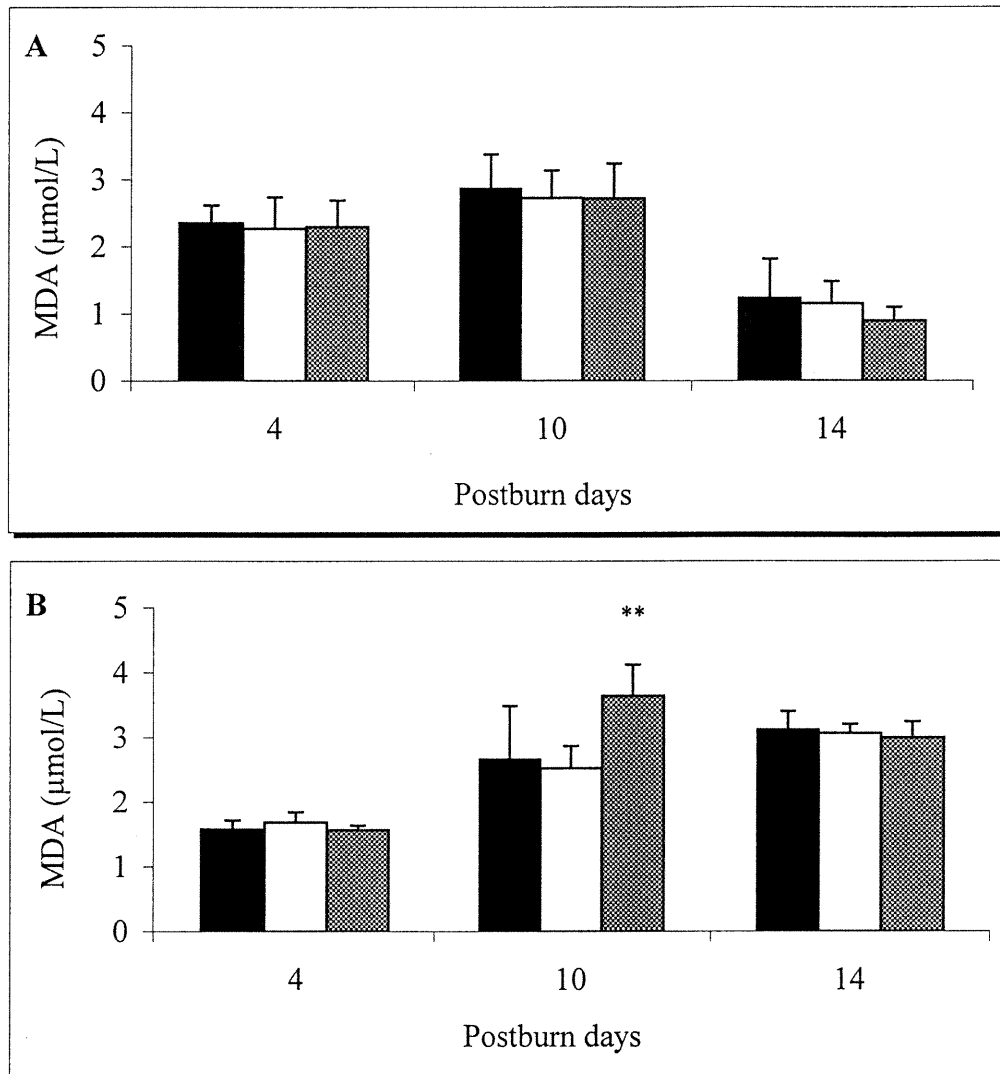


**Figure 2.** Endotoxin-resistant mice present stronger and persistent inhibition of proliferation in response to anti-TcR Antibody (H57).



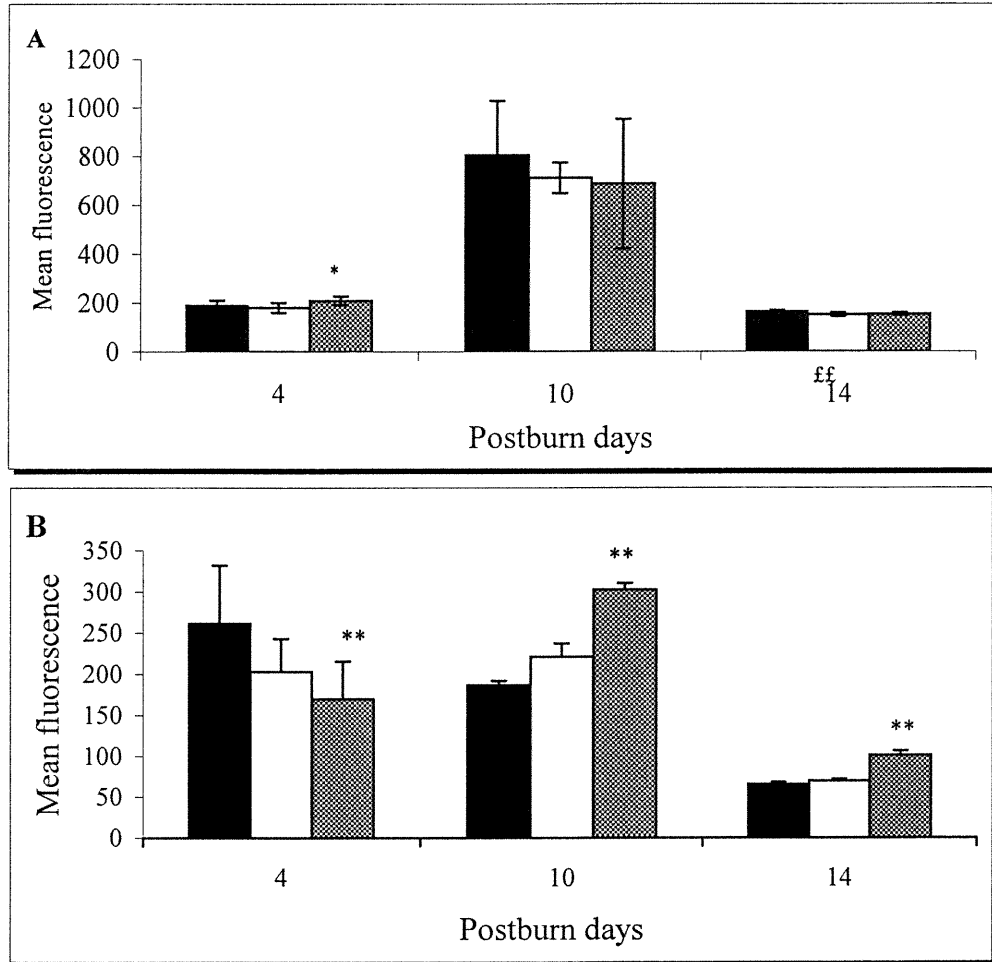
The splenocytes response to H-57 stimulation in the normally-responding (C3H/HeN) (A) and endotoxin-resistant (C3H/HeJ) (B) strains was measured at 1, 4, 7, 10, 14 days post-injury. Proliferative ratios that compare buprenorphine sham-burn mice to saline mice (continuous line) and buprenorphine sham-burn to burned mice (solid bars) are presented. On every experimental day, spleens were collected from 5 mice in each group. Individual mice splenocytes ( $2 \times 10^5$  cells/well) were stimulated in triplicate with anti-TcR antibody-coated plates ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) which were incubated under standard conditions for 66 h and pulsed for an additional 6 h with [ $^3\text{H}$ ]-thymidine. The results are expressed as mean proliferation in 5 mice per group. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  for burn vs buprenorphine-treated mice, £ $p < 0.05$  and ££ $p < 0.01$  for buprenorphine-treated mice vs saline.

**Figure 3.** Endotoxin-resistant mice show a higher concentration of liver malonaldehyde (MDA) 10 days post-burn injury.



Lipid peroxidation product concentrations were assessed in the normally-responding (A) and endotoxin-resistant (B) strains by colorimetric assay on days 4, 10 and 14 after burn or sham injury. For each experimental day, liver sections of 5 animals per group were homogenized individually. MDA was measured by colorimetric assay of liver homogenate supernatants produced in duplicate. MDA concentrations of the samples were determined at 586 nm of absorbance. The test sensitivity is 0.1 nmol/ml. The results are presented as mean MDA concentrations in 5 animals per group. Data on MDA in the saline group (solid bars), the buprenorphine group (empty bars) and the burn group (hatched bars) are presented. \*\* $p < 0.01$  for the burn group compared to buprenorphine.

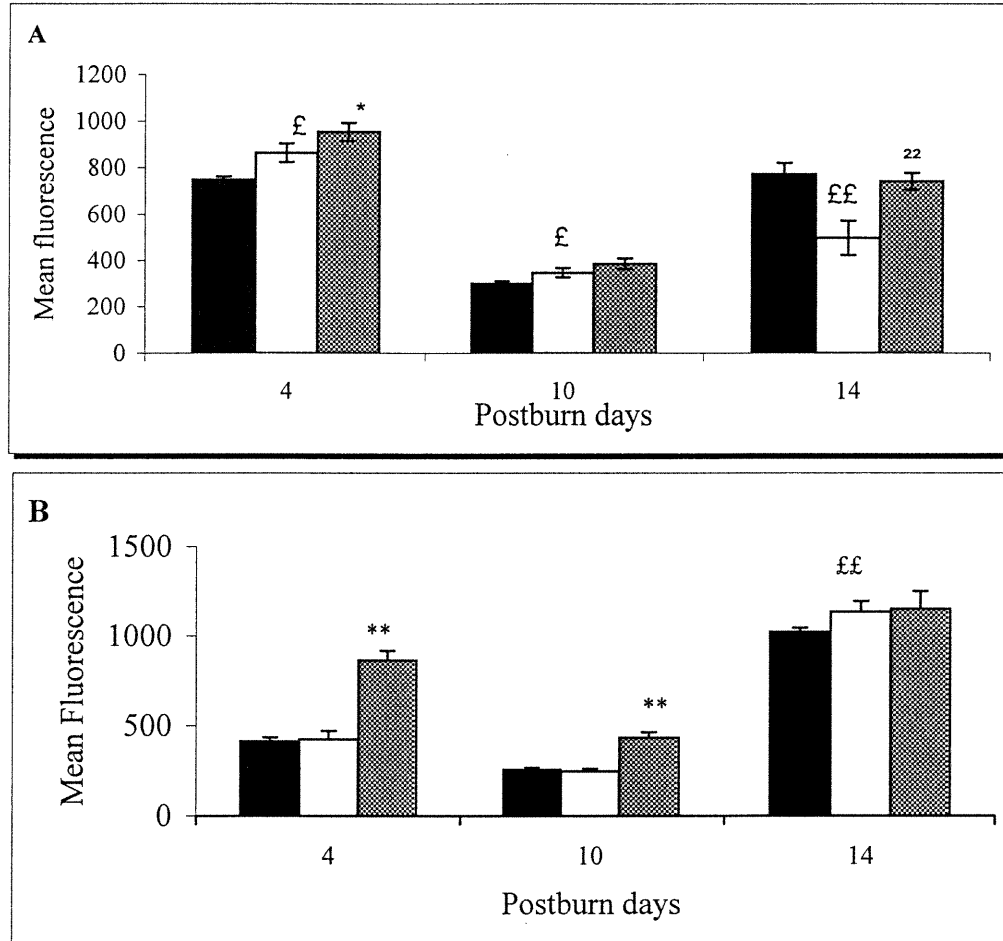
**Figure 4.** Increased mitochondrial activity is time-related in burned endotoxin-resistant- mice



Mitochondrial activity was measured in the normally-responding (A) and endotoxin-resistant (B) strains by the use of rhodamine 123. For every experimental day, splenocytes suspension from each animal (5 per group) were adjusted to a concentration of  $5 \times 10^6$  cells/ml. These suspensions and rhodamine 123 ( $10 \mu\text{M}$ ) were incubated for 30 min at  $37^\circ\text{C}$  in a humidified atmosphere with 5%  $\text{CO}_2$  and immediately analyzed by cytometry. The results are presented as mean mitochondrial activity in 5 animals per group. Mitochondrial activity was measured in the saline group (solid bars), the buprenorphine group (empty bars) and the burn group (hatched bars) on days 4, 10 and 14 after burn injury.

\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  for burn vs buprenorphine-treated mice, £ $p < 0.05$  and ££ $p < 0.01$  for buprenorphine-treated mice vs saline.

**Figure 5.** Endotoxin-resistant mice show spleen thiol concentrations



Thiol concentrations in the spleen were measured with a CMFDA probe which represents an index of glutathione concentration in normally-responding (A) and endotoxin-resistant (B) strains. For every experimental day, splenocyte suspensions from each animal (5 per group) were adjusted to a concentration of  $5 \times 10^6$  cells/ml. These suspensions and the CMFDA probe ( $5 \mu\text{M}$ ) were incubated for 10 min at  $37^\circ\text{C}$  in a humidified atmosphere with 5%  $\text{CO}_2$ . Luminescent signals were recorded by flow cytometry. The results are presented as mean spleen thiol concentration in 5 animals per group. Thiols were measured in the saline group (solid bars), the buprenorphine group (empty bars) and the burn group (hatched bars) on days 4, 10 and 14 after burn injury. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  for burn vs buprenorphine-treated mice, £ $p < 0.05$  and ££ $p < 0.01$  for buprenorphine-treated mice vs saline.

## **CONCLUSIONS**

## 2. CONCLUSIONS DU DEUXIÈME ARTICLE

Les résultats de cette étude ont permis d'établir de nouvelles informations concernant le rôle de la sensibilité à la LPS dans l'immunosuppression subséquente à une brûlure. En effet, nous avons montré qu'une faible réponse inflammatoire induite par les endotoxines est associée à une immunosuppression et un stress oxydatif importants. Ainsi, d'après ces résultats, nous pouvons supposer que l'induction d'une réponse inflammatoire normal après une brûlure n'est pas responsable de l'immunosuppression subséquente. Dans notre modèle animal, l'immunosuppression, tel que montré par les résultats sur la prolifération de splénocytes activés, est maximale 10 jours après la brûlure. La population des cellules T est la plus affectée par l'immunosuppression et les changements dans les populations de cellules ( $CD4^+$  et  $CD8^+$ ) ne peuvent expliquer cette suppression. Toutefois l'augmentation du niveau de stress oxydatif, démontré par la peroxydation des lipides dans le foie, les thiols totaux et le potentiel transmembranaire mitochondrial des splénocytes, et l'hyperactivation de la réponse immunitaire expliqueraient la profonde immunosuppression présente chez les souris LPS-résistantes. En effet, il nous apparaît qu'en contournant la réponse inflammatoire médiée par les endotoxines, il y ait une augmentation significative de l'activation des cellules accessoires, tel que reflété par les taux de stress oxydatif, et que cette hyperactivation engendre une anergie profonde des cellules T chez ces souris. Ainsi, ce modèle *in vivo* suggère que la présence d'une réponse inflammatoire normale est nécessaire pour assurer les fonctions immunitaires de défense après une brûlure sévère. Toutefois, l'utilisation de ce modèle animal a permis de démontrer que l'augmentation des niveaux de stress oxydatif, associée à la production de médiateurs inflammatoires et immunosuppresseurs, jouerait un rôle important dans l'induction de l'immunosuppression sous-jacente à une brûlure sévère.

## **JUSTIFICATIONS**

### 3. JUSTIFICATIONS DE LA TROISIÈME ÉTUDE

L'étude précédente a montré qu'une augmentation du niveau de stress oxydatif est directement relié à la sévérité de l'immunosuppression après une brûlure. Le stress oxydatif est causé par un déséquilibre entre les activités oxydantes et antioxydantes de l'organisme. Plusieurs évidences suggèrent que l'augmentation du stress oxydatif serait un des mécanisme importants par lequel un excès de lipides dans l'alimentation inhibe la réponse du système immunitaire. Toutefois les mécanismes précis qui expliquent les effets délétères d'un excès de lipides de l'alimentation après une brûlure sont mal compris. Ainsi à l'aide d'un modèle expérimental, l'administration des différentes quantités de lipides de la diète a été étudié afin de vérifier le rôle des lipides dans la réponse immunitaire et dans l'induction du stress oxydatif après une brûlure sévère.



**V. ARTICLE 3**

**Improved immune functions with administration of a low-fat diet  
in a burn animal model**

Nathalie Jobin<sup>1</sup>, Dominique R. Garrel<sup>1</sup>, Julie Champoux<sup>2</sup>, Jacques Bernier<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centre des grands brûlés, Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-Hôtel-Dieu, Montréal, PQ, Canada, and <sup>2</sup> Centre de recherche en santé humaine, INRS Institut-Armand Frappier, Pointe-Claire, PQ, Canada

This work was supported in part by Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) and the Fondation des Pompiers du Québec pour les Grands Brûlés (FPQGB).

Short running head title: Low-fat diet and burn injury

**Référence :** Cellular Immunology 206, 71-84, 2000.

### Abstract

The purpose of this study was to characterize the impact of a low-fat (LF; 1% fat) diet, a high-fat (HF; 25% fat) diet and a standard (SD; 5% fat) diet on immune and oxidative parameters in a 20% body surface area burn animal model fed *ad libitum* for 10 days post-injury. Although the mechanisms are poorly understood, the amount of dietary lipids in nutritional support has been shown to have immunomodulatory effects after burn injury. Burned mice fed the LF diet showed a normal response in activated splenocyte proliferation compared to burned animals that received the SD or HF diet. Animals fed the SD and the HF diet presented increased production of nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> response after burn injury which is associated with an inhibited splenocyte proliferation. The total thiol concentration in spleen cells from burned animals kept on the HF diet was significantly higher than in unburned animals, while no increase of these oxidative parameters was observed in LF-fed burned animals. Moreover, the LF diet significantly reduced hepatic lipid peroxidation, as measured by malonaldehyde concentration, compared to the other 2 diets. These results suggest that the administration of a LF diet in a mice after a burn injury prevents inhibition of *in vitro* splenocyte proliferation and reduces the intensity of oxidative stress.

Key words: burns, dietary lipids, immunosuppression, oxidative stress

## Introduction

Severe burn injury induces an immediate systemic response that leads to the development of pathophysiological alterations, including extensive nitrogen loss, malnutrition, a markedly increased metabolic rate and immunologic deficiency (1-4). The intensity and duration of these phenomena are associated with morbidity and mortality (1,2). Severe injury induces systemic immune suppression and clinical T-cell anergy that predispose patients to infection and sepsis caused by opportunistic pathogens (1,5). The mediators and mechanisms responsible for this immune dysfunction remain controversial.

Nutritional support is now recognized as an important determinant of the clinical outcome and immune response of severely burned patients, with inadequate nutrition resulting in delayed wound healing and increased infectious episodes (6-10). Dietary fatty acids influence host immunity via structural alteration and chemical mediation (10,11). Both dietary fat concentration and type have been reported to modulate various immune system indices in several human and animal studies (12-14). Existent evidence suggests that lipids may not be an effective caloric source after severe burn injury, and that some components of the lipid molecule may interfere with certain aspects of immune functions (15). Animal experiments have shown that low-fat (LF) enteral solutions have a protein-sparing effect after thermal injury and improve wound-healing (16,17). In burn patients, infectious morbidity was decreased and length of care shortened when LF nutritional support (15% energy total) was compared to a normal diet (30% energy total) (18). Burn patients fed a LF diet showed reduced serum concentrations of interleukin-6 and interleukin-2 receptor alpha chain, suggesting that dietary fat can modulate the inflammatory response and immune functions subsequent to thermal injury (19,20).

In the inflammatory response, macrophages are mainly responsible for cytokine production as well as arachidonic acid by-products, including thromboxanes and prostaglandins (PG). A relationship between increased prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) released

by macrophages and burn-induced immunosuppression has been established on the basis that, *in vivo* and *in vitro*, indomethacin improves impaired immune functions (21-23). Overactivation of the arachidonic acid pathway, by providing elevated amounts of the precursor of linoleic acid, may be responsible for the observed deleterious effects of excess dietary lipids after severe burn injury. However, PGE<sub>2</sub> is not likely to be the only participant because it has been reported that cyclooxygenase inhibitors do not correct burn-induced immunodeficiency (15,24,25). Consequently, the participation of other mediators should explain burn-induced immunodeficiency.

The level of cellular oxidative stress, including the release of nitric oxide (NO), the production of end-product lipid peroxidation, and antioxidant/oxidant balance, may also be responsible for these immune system impairments (26,27). By using an endotoxin-resistant mouse strain and a normally-responding mouse strain, we have shown that increased oxidative stress, induced by a weak inflammatory response, is associated with pronounced and sustained immunosuppression after burn injury (27). The latter study demonstrated that an inflammatory response following burn trauma is beneficial for the immune system. Moreover, the increase in oxidative stress is directly related to the severity of immunosuppression. Recent evidence indicates that heightened oxidative stress may be one of the important mechanisms by which polyunsaturated dietary fats inhibit the immune response (12). The precise mechanisms by which an excessive amount of dietary fat has deleterious immune effects after burn injury are not well understood.

In this study, we have administered different amounts of dietary lipids after burn injury to investigate their relationship to oxidative parameters and the immune response. Our results revealed that a decrease in dietary lipids has a beneficial effect on the health of mice by decreasing oxidative stress and restoring immune function. The importance of diet after severe injury will be discussed in the context of immune competence.

## Materials and methods

### Animals

All experiments were performed on 7-week-old female C3H/HeN mice (Charles River, Montreal, Quebec, Canada). Forty-five animals were used in this study. The mice were acclimatized for a period of 1 week prior to the initiation of any procedures and were housed in a central animal facility under strictly-controlled temperature, relative humidity and a 12-hour light/dark cycle. They were kept in cages each containing 2 or 3 mice. The Institutional Animal Care Committee reviewed and approved all procedures performed in accordance with Canadian Council on Animal Care guidelines.

### Alzet Micro-osmotic Pump

Alzet micro-osmotic pumps (Alza Corporation, Palo Alto, CA), delivering continuous analgesic solution for 14 days, were utilized in this study. Buprenorphine (Reckitt and Coleman Pharmaceuticals, Richmond, VA), a member of the opioid family, was the drug chosen to control pain. The pumps deliver 0.1 mg/kg of buprenorphine per 12 h. For a 20-g mouse that is the equivalent of 2.0  $\mu$ g/12 h of buprenorphine. On the experimental day, the pumps were inserted subcutaneously in the peritoneal cavity of anesthetized animals. Anesthesia was delivered by intraperitoneal (ip) injection of 0.1 ml/10 g body weight of a saline solution containing 13.3 mg/ml ketamine (MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario, Canada) and 1.3 mg/ml xylazine (Bayer, Etobicoke, Ontario, Canada), after which the entire dorsal and upper sternal regions were shaved. The wound was closed with surgical sutures.

### Experimental Thermal Injury

The animals were randomized into 3 equal groups of 15 mice as follows: 1. Control animals with sham procedures, 2. Buprenorphine with sham burn, and 3. Buprenorphine with burn injury. Detailed procedures for burn injury have been described in a previous paper (27). Briefly, once each mouse was anesthetized, the dorsum was shaved, the Alzet micro-pumps were inserted, and the animal immersed for 6 sec in water of either

room temperature (22°C) for sham burn or 90°C to produce a full-thickness 20% body surface area (BSA) burn. Both sham and burn-injured mice were resuscitated after injury by 2 ml of normal saline ip. The cages were placed on a heating pad at 37°C until the animals were fully awake and they were then returned to the animal facility. They and their food were weighed daily, and a topical antibacterial agent (Silver Sulfadiazin Cream, Smith and Nephew, Lachine, Quebec, Canada) was applied to the burned areas. Daily macroscopic examination showed no evidence of infection. All animals survived the procedures. Burned mice moved, ate and drank normally throughout the 10-day experiment.

### **Diets**

Five animals from each group (a total of 15 animals per diet) were randomly assigned to 1 of the 3 diets that differed in lipid content. The control group (SD) received the standard diet that contained 5% fat (2.5% corn oil and 2.5% lard). The low-fat (LF) group was fed a 1% fat diet (corn oil) and, finally, the high-fat (HF) group was given a 25% fat diet (12.5% corn oil and 12.5% lard). The LF diet provided 2% of caloric intake as fat (3% of nonprotein calories) while the SD diet provided 11% of total calories as fat (14% of nonprotein calories) and, finally, 45% of caloric intake was from fat in the HF diet (54% of nonprotein calories). The vitamin and mineral contents of all diets were identical. Chow (Purina Test Diet, Richmond, IN) and water were provided *ad libitum*. The composition of these diets is given in Table 1. The animals were fed the diets immediately after the procedures and for 10 subsequent days. During the acclimatization phase, all of them were kept on standard rodent chow (LabDiet, Prolab RMH 2500, PMI Nutrition International, Brentwood, MO) used typically in our animal care facility.

### **Sacrifice and Organ Preparation**

In our burned animal model, we have already demonstrated that the peak of immunosuppression occurred 10 days after a 20% BSA burn injury (27). Consequently, in this study, the immune and oxidative parameters were evaluated on this same post-injury day. Ten days after the procedures, the animals were anesthetized with Enflurane and killed by cardiac puncture as well as cervical dislocation. The spleen and blood

were removed and prepared immediately for analysis while the livers were frozen immediately in liquid nitrogen after dissection and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the assay was performed.

### **Preparation of Spleen Suspensions**

Spleens were removed aseptically and prepared individually as single cell suspensions with 3 ml of Hank's balanced solution (HBSS, Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada). Splenocyte suspensions were obtained by teasing apart the splenic matrix. The suspensions were washed 3 times in HBSS containing antibiotics (100 IU/ml penicillin and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin) (Medicorp Inc., Montreal, Quebec, Canada), and red blood cells were removed with lysis buffer (Gey's solution with  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). The cells were resuspended in RPMI 1640 media (Gibco BRL) supplemented with 50  $\mu\text{M}$  2-mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, MO), 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco BRL) and antibiotic solution. Cell viability was determined by trypan blue exclusion and was consistently greater than 90%. The cells were adjusted to a desired concentration in complete RPMI.

### **Proliferative Response Assay**

Detailed procedures for the proliferative response assay have been described in a previous paper (27). Briefly, spleen cell cultures were produced in triplicate, in 96-well, flat-bottom tissue culture plates (Falcon, Becton-Dickinson, Lincoln Park, NJ) at  $2 \times 10^5$  viable cells/well. Splenocytes were stimulated with 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Concanavalin (Con-A) (Sigma), 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  lipopolysaccharide LPS (Sigma) or coated anti-TcR mAb H-57-597 (H-57). The plates were coated with 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-TcR antibody. After 66 h of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere with 5%  $\text{CO}_2$ , the cultures were pulsed for 6 h with 0.5  $\mu\text{Ci}/\text{well}$  of  $[\text{H}^3]\text{TdR}$  (52.0 Ci/mmol, Amersham Canada, Oakville, Ontario, Canada).  $[\text{H}^3]$ -thymidine incorporation was used as an index of cell proliferation and was measured by liquid scintillation counting (counts per minute, cpm).



### **Nitrite Determination**

Spleen cell cultures were established as described above and were stimulated with 1  $\mu\text{g/ml}$  Con-A or 50  $\mu\text{g/ml}$  LPS (Sigma). NO production was quantified by the accumulation of nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), a stable NO end-product, in culture supernatants after 66 h of incubation, by colorimetric microassay. Briefly, 50- $\mu\text{l}$  aliquots of culture supernatant were mixed with equal volumes of Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-naphthylethylenediamine dihydrochloride, 2.5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) (28). Samples were tested in triplicate. Absorbance at 550 nm was determined in an automated plate reader (Power Wave, Bio-Tek Instruments, Winsooski, VT).  $\text{NO}_2^-$  concentrations were calculated from a sodium nitrite standard curve and expressed in micromoles.

### **PGE<sub>2</sub> Determination**

The amount of PGE<sub>2</sub> in spleen cell supernatants of Con-A- or LPS-stimulated cells was determined by enzyme immunoassay (R & D Systems, Minneapolis, MN). Manufacturer's instructions were followed. Briefly, free PGE<sub>2</sub> competes with alkaline phosphatase-labeled PGE<sub>2</sub> for fixation to a mouse monoclonal antibody bound to goat anti-mouse antibody coated onto the microplate. Enzymatic substrate was added to the samples, and optical density was read at 405 nm. Samples were tested in duplicate. The sensitivity of the PGE<sub>2</sub> assay is typically less than 36.2 pg/ml.

### **Liver Malonaldehyde (MDA) Determination**

On the day of measurement, liver sections were thawed and washed with cold 0.9% saline. The samples were maintained on ice throughout the experiment to avoid *de novo* oxidation. Liver MDA concentration was determined as described previously (27). Briefly, the protein content of each sample was measured by a protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA), and MDA was quantified by colorimetric assay of liver homogenate supernatants, according to the manufacturer's instructions (R & D Systems). The minimal MDA concentration that can be measured in this assay is 0.1 nmol/mL.

## **Flow Cytometry**

### **Immunophenotyping**

Cells were analyzed by 3-color flow cytometry with FACScan<sup>®</sup> (Becton-Dickinson). Splenocytes ( $10^6$  cells/100  $\mu$ l) were incubated for 30 min on ice in the presence of fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies: rat anti-mouse anti-CD4 FITC-labeled molecule (H129.19) (Sigma), rat anti-mouse anti-CD8 (53-6.7) conjugated to R Phycoerythrine (Sigma), and rat anti-mouse anti-CD3-labeled RED 670 (29B Quantum Red) (Sigma). The cells were then washed twice with cold PBS and analyzed. Lyse software was used for the analysis.

### **Measurement of Thiol Concentrations in Spleen Cells**

Total spleen thiols were measured with a 5-chloromethylfluorescein-diacetate (CMFDA) (Molecular probe, Eugene, OR), a thiol-reactive fluorescent dye that is stable and can differentiate cellular low molecular weight thiols (29). With this probe, thiol concentrations reflect low molecular weight sulfhydryls, of which glutathione is the most prevalent. For this experiment, the splenocyte suspensions were adjusted to a concentration of  $5 \times 10^6$  cells/ml. The CMTDA probe (5  $\mu$ M) was added to a solution of cells and HBSS supplemented with 0.1% bovine serum albumin (Fraction V, USB, Cleveland, OH) at pH 7.3. The thiol dye attains maximal staining after 10 min at 37°C. Luminescent signals were recorded by flow cytometry on FACScan<sup>®</sup>.

### **Measurement of Mitochondrial Potential of Spleen Cells**

Mitochondrial inner transmembrane potential was detected by rhodamine 123, a vital fluorescent dye used in flow cytometry (30). As it is specifically concentrated in mitochondria because of the transmembrane potential that these organelles maintain in living cells, rhodamine 123 is a good probe for monitoring mitochondrial activity. Splenocyte suspensions prepared for proliferation assay were adjusted to a concentration of  $5 \times 10^6$  cells/ml. For this experiment, rhodamine 123 (10  $\mu$ M) was added to a solution of cells and HBSS supplemented with 0.1% bovine serum albumin at pH 7.3, then incubated for 30 min at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. The samples were analyzed immediately by flow cytometry. Propidium iodide- marked cells (dead

cells) were excluded by live gating, and the green fluorescence of living cells was restricted to the mitochondria.

### **Statistical Analysis**

The effects of diet, medication and group were assessed by analysis of variance for repeated measures. Simple main effects and pairwise multiple comparisons were calculated for significant interactions to highlight group or diet differences. A 0.05 (uncorrected) alpha level was used for all analysis. The statistical comparisons used is  $n=5$  for each group.

## **Results**

### **Chow Intake and Weight Gain**

To determine if the lipid content of diets or burn injury can change nutritional status impairing animal growth and influencing the immune parameters studied, chow intake and body weight were measured daily. Table 2 reports the cumulative chow intake for each group receiving the 3 experimental diets during the 10 days post-injury. Food intake was calculated as mean consumption per group ( $n=5$ ) by weighing the chow daily. The results presented are representative of 2 independent experiments for each diet. As we have previously reported (27), surgical manipulation in the sham group or in the 20% BSA burn injury group did not significantly decrease chow intake. The control and buprenorphine groups were no different in terms of total caloric intake. Burned animals on the LF and SD diets showed an increase in their caloric intake compared to the buprenorphine group (+17 kcal/d and +25 kcal/d for the LF and SD diets respectively), while no such increase was found in the burned group fed the HF diet. In fact, control and buprenorphine animals kept on the HF diet had a higher caloric intake than their respective counterparts given the other 2 diets (+20 kcal/d and +19 kcal/d for controls and buprenorphine, respectively). The higher caloric content of the HF diet can explain the discrepancies not observed when intake was measured in terms of grams consumed. Finally, the total caloric intake of burned animals did not differ between the 3 diets.

Total weight gain was calculated by the difference between weight on day 10 post-injury versus weight on experimental day 0 (Table 3). Animal weight was adjusted, considering the weight of the pumps and the quantity of buprenorphine delivered each day. The buprenorphine and burned groups presented a lower weight gain than the controls despite their equal or higher caloric intake, indicating an hypercatabolic state in these groups of mice. Not surprisingly, given the higher caloric intake, consumption of the HF diet produced greater weight gain in control and buprenorphine animals.

### **Ex vivo Splenocyte Proliferation in Response to Various Stimuli**

A previous study with the C3H/HeN mouse strain showed that maximal impairment of T-cell proliferation was obtained at day 10 after burn injury (27). To determine if the amount of lipids in the diet given after burn injury can influence splenocyte function, the proliferative response to Con-A, anti-TcR antibody (H-57) and LPS was investigated.

To clearly delineate the buprenorphine and burn injury effects, the data were presented in terms of the percentage of stimulation index calculated for each group as follows: 1. the control group has been considered as 100%; 2. Buprenorphine effect: the mean cpm of mice receiving buprenorphine was divided by the mean cpm of the controls; 3. Burn effect: the mean cpm of burned mice was divided by the mean cpm of the group that received buprenorphine. Thus, the response obtained in the buprenorphine groups was compared to the untreated groups and the response of the burned groups was compared to the sham groups receiving buprenorphine. The results represent the mean value of stimulation index calculated for each group (n=5) and are representative of 2 independent experiments for each diet. Figure 1 shows that the proliferative response of buprenorphine mice to Con-A and LPS stimulation, represented by index stimulation of splenocytes from the sham-buprenorphine groups, did not differ significantly from the control mice for any group receiving the 3 diets. These results confirm those already obtained in a previous paper reporting that *in vivo* buprenorphine administration does not have an immunosuppressive effect on splenocyte proliferation (27). Moreover, considering the effect of 10 days feeding with different diets, no significant differences in the splenocyte proliferative response to Con-A, anti-TCR mAb and LPS mitogen

were observed between the different control groups from each diet. Burn injured animals fed the HF and SD diets for 10 days exhibited significant suppression of the spleen cell proliferative response after stimulation with Con-A, anti-TcR mAb or LPS (Figure 1). The splenocyte proliferation in the HF-burned group was depressed by 79, 78 and 79% compared to sham burn animals for Con-A ( $p < 0.01$ ), H-57 ( $p < 0.01$ ) and LPS ( $p < 0.01$ ) respectively. The splenocyte response of burned mice fed the SD diet was decreased significantly by 30, 93 and 25% compared to sham burn mice for Con-A ( $p < 0.05$ ), anti-TcR mAb ( $p < 0.01$ ) and LPS ( $p < 0.05$ ), respectively. On the other hand, the decrease of lipids from 5% to 1% in the diet after burn injury led to recovery of the normal proliferative response of spleen cells to the above-mentioned mitogens. Thus, a reduced lipid content of diet after burn injury has beneficial effects on the proliferative response to T-cell and B-cell mitogens.

We have previously demonstrated a decreased proliferative response of spleen cells as early as 4 days after burn injury in mice receiving a standard amount of dietary lipids (27). To evaluate, in LF groups, the time necessary to recover a normal response after this type of trauma, animals were burned and fed the LF diet or the SD diet for 4 days before measurement of the proliferative response to Con-A, H-57 and LPS. No difference in the proliferation response was found between control and buprenorphine sham-burn animals (data not shown). Figure 2 shows the percentage of stimulation of burn animals compared to the proliferation of the group receiving the buprenorphine. Burned mice given the LF diet for 4 days presented a normal proliferative in response to Con-A and H-57, compared to their controls while the mice given the SD diet presented a suppressed response with those same mitogens ( $p < 0.05$  for each mitogens). The LPS stimulation showed inverse results: an inhibited response with the LF diet ( $p < 0.05$ ) and a normal proliferative response with the SD diet. Overall, these results revealed that the reduced lipids in their diets after burn injury had an early beneficial effect on T-cell whereas the polyclonal response to LPS was inhibited.

### **In vitro NO Production by Spleen Cells in Response to Con-A and LPS Stimulations.**

It has been suggested that macrophages exert suppressive activity on T-cells through NO release (31). Since NO production can be influenced by lipids in the diet (32), we measured NO production in vitro, when LF, SD or HF diets were administered for 10 days after injury, in Con-A- and LPS-stimulated splenocytes. As shown in Table 4, no significant changes were found between the 3 control groups for each diet after Con-A stimulation. In contrast, after LPS stimulation, a reduced concentration of NO was found in the control group fed the HF diet as compared to the other two diets. In both experimental condition, NO production of splenocyte from buprenorphine-treated and control mice was similar, demonstrating that surgery and the administration of this opioid did not affect NO production by spleen cells from each diet group. NO production by Con-A-stimulated spleen cells from burned animals fed the HF diet presented a 3.5-fold ( $p < 0.01$ ) and a 2.1-fold ( $p < 0.01$ ) increase compared to the controls and sham burn-buprenorphine mice, respectively. Similar results were obtained after LPS-stimulation in SD and HF diet group. Administration of the LF diet after burn injury reduced NO production to a level that did not differ from that of the sham burn-buprenorphine or control groups for both stimuli. Thus, administration of the SD and the HF diet after burn injury causes an increase of NO production in Con-A and/or LPS-stimulated splenocytes that is not seen with the LF diet.

### **In vitro PGE<sub>2</sub> Production by Spleen Cells in Response to Con-A and LPS Stimulations.**

In view of the cross-regulation between the cyclooxygenase (COX) and NOS (NO synthase) pathways (33), PGE<sub>2</sub> was measured in cultured supernatants of Con-A or LPS-stimulated spleen cells from mice receiving LF, SD or HF diets after burn injury. Table 4 shows that splenocytes stimulated with Con-A from mice fed the HF diet produced significantly more PGE<sub>2</sub> than the LF diet group, independently of the burn injury. Interestingly, after LPS stimulation no such increase was found in control animals. A significant increase was observed in the effect of burn trauma compared to control mice on the three diets for both stimuli. However, PGE<sub>2</sub> production was

heightened to the same extent as in the sham-buprenorphine groups after Con-A stimulation. The latter effect was observed only in the LF diet after LPS stimulation. Thus, we conclude from these results that the increase of dietary lipids leads to a general augmentation of PGE<sub>2</sub> production in control mice after Con-A stimulation (6.8-fold rise compared to the LF diet). In terms of burn injury, the rise in PGE<sub>2</sub> noted was associated with buprenorphine use rather than the trauma itself. The present data showed that buprenorphine administration with or without burn injury can result in an increase of PGE<sub>2</sub> production that does not correlate with NO production.

### **Immunophenotyping**

Burn injury is associated with a change in cell populations that may be partially responsible for immunosuppression (34). To determine if dietary lipid content can influence the percentage of T-cells and the ratio of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in the spleen, we performed immunophenotyping analysis of these cell population after burn injury and administration of the 3 diets. Burned animals presented a significant decrease of CD4 and CD8 subsets in lymphocyte-gated cells compared to the buprenorphine or control group for the three diets ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  for the LF, SD and HF, respectively). Despite this reduction of subsets, the ratio between helper/inducer and suppressor/cytotoxic subsets was significantly increased in burned animals fed the LF diet ( $p < 0.05$  compared to the buprenorphine group) while it remained unchanged in groups given the SD and HF diets. This elevation was due to a more marked decrease of CD8 cells and not CD4 cells (Table 5).

### **Oxidative Stress Parameters**

We have reported previously that reduced T-cell function after burn injury is associated with an increased oxidative stress response in C3H/HeJ mice, an endotoxin-resistant strain (27). In contrast, no correlation between these 2 parameters was observed in C3H/HeN mice, a normally-responding strain (27). Thus, the C3H/HeN strain burn injury model gave us the opportunity to determine the correlations among lipid levels in the diet and the oxidative stress response. We addressed these questions by measuring lipid peroxidation in the liver and thiol levels in splenocytes.

Hepatic MDA concentration after burn injury in mice subjected to the 3 diets was quantified 10 days after trauma. This measurement of the liver end-product of lipid peroxidation provided information on hepatic oxidative metabolism after burn injury. Administration of different diets for 10 days led to a marked reduction of MDA in the control group receiving the LF diet ( $p < 0.01$ ) compared to control mice in the SD and HF groups (Figure 3). Independently of diet, no increases of MDA levels were observed in animals 10 days after burn injury. Continuous administration of buprenorphine did not affect the hepatic concentration of its metabolite. From our experiment, we found that reduced lipids in the diet caused a decrease of lipid oxidation in the liver, but an increase of dietary lipids had no detrimental effect on this parameter after burn injury.

To establish the impact of dietary lipids on the anti oxidative capacity of splenocytes after burn injury, we measured thiol levels with the CMFDA probe as shown in Figure 4. The data are expressed as percentages of control spleen cell fluorescence: the buprenorphine group was expressed as the percentage of control group mean fluorescence, and the burn group as the percentage of buprenorphine mean fluorescence. The percent of lipids in the diet had no effect on thiol concentration in each control group (Figure 4). We also found that mice fed the LF or the SD diet had comparable thiol concentrations either in sham burn or burn injury. However, an increase of dietary lipids caused a significant rise of thiol concentration in splenocytes of the burned groups ( $p < 0.01$ ). We can conclude that HF diet administered after burn injury elicits an elevation of thiol in splenocytes that could be due to heightened esterase activity and/or an augmentation of glutathione concentrations associated with oxidative stress in spleen cells.

#### **Metabolic Activity of Splenocytes after Burn Injury**

An increase of metabolic activity in splenocytes has been demonstrated previously in the presence of oxidative stress (27). To evaluate the involvement of dietary lipids in the metabolic activity of splenocytes after burn injury, we assessed this parameter by rhodamine 123 staining. The results are expressed for the buprenorphine group as the percentage of control group mean fluorescence, and for the burn group as the percentage



of buprenorphine mean fluorescence. The data showed that the 3 diets used in this study had no effect on the metabolic activity of spleen cells in control mice. In the LF diet mice (Figure 5), we observed that buprenorphine administration and burn injury induced 16% and 27% increases in metabolic splenocyte activity, respectively ( $p < 0.01$  for both situation). The SD groups presented no modification of rhodamine 123 staining, showing no alteration between sham and burn injury. In contrast, the metabolic activity of splenocytes from burned mice fed the HF diet was increased by 62% compared to sham-buprenorphine animals ( $p < 0.01$ ). Overall, this demonstrates that the higher metabolic activity of the HF diet groups correlates with the augmented oxidative stress after burn injury.

### Discussion

In this study, the influence of dietary lipid percentage on immunosuppression and associated factors was determined after burn injury. The decrease from 5 to 1% of lipid content in the diet after burn trauma in mice fed for 10 days had a beneficial effect on the proliferative response of spleen cells after mitogenic stimulation. This positive effect of dietary lipid reduction was also observed at day 4 following burn injury. To determine the parallel between % lipids in the diet and the decreased splenocyte proliferative response, several parameters involving lipid metabolism were measured. Administration of SD diet and HF diet induced an increase of NO production in burned mice. Surprisingly as opposite to LPS stimulation, burn injury had no effect on PGE<sub>2</sub> production in Con-A-stimulated splenocytes. However, the elevation of dietary lipids leads to a significant increase in PGE<sub>2</sub> production after Con-A stimulation. The administration of different diets had no effect on the decrease of total T-cells induced by thermal injury, although burned animals that received the LF diet did present an increase of T helper/T cytotoxic-suppressor cells. This change was due to a more pronounced reduction of CD8 cells. Finally, we observed that the LF diet diminished MDA in all groups independently of burn trauma. Considering the thiol concentration in splenocytes, an increase was noted in the HF diet group in association with burn injury. This latter effect observed with the HF diet was also seen with a 62% rise in metabolic

activity measured by mitochondrial activity. Overall, these results show that the LF diet administered after burn injury reduced impairment of the splenocyte response. On the other hand, the HF diet caused inhibition of the immune response with heightened oxidative stress, demonstrating the detrimental effect of lipids after this severe trauma. Severe burn injury induces major metabolic disturbances that lead to a state of malnutrition with its accompanying deleterious actions on wound healing, the immune system, and survival if nutritional support fails to supply an adequate amount of nutrients and energy (35,36). Studies in animal models have provided evidence that dietary lipid components exert potent and pervasive effects on several factors of immune functions (37). Alexander et al. (15) first showed that dietary levels between 5 and 15% of non-protein calories are optimal for nutritional support after burn injury. These results were confirmed by others (38). The present study produced original data indicating that a lower dietary lipid level is a good choice regarding immune and oxidative functions observed after burn injury. We found that a diet containing 3% of non-protein calories from fat (2% of total calories) prevented the immunosuppression subsequent to thermal injury and abolished the liver and/or spleen oxidative stress compared to the SD and HF diets (14% and 54% of non-protein calories as fat, respectively).

Our results showed that burn injury induced higher total energy intake than control or buprenorphine group animals fed LF or SD diets while no such burn increase was seen with the HF diet. However, mean caloric intake during the 10 days post-injury was similar between all burned animals given the 3 experimental diets. Consequently, as we already noted (27), our results demonstrated that malnutrition in injured animals can not account for the decreased immune response. A minimum of 1% to 2% lipid, provided as corn oil, is needed to prevent essential fatty acid deficiency in mice (39); animals fed the LF diet (containing 2% of total energy from corn oil) received sufficient dietary lipids to meet their essential fatty acid requirements. Also, to ensure that animals on the HF diet received enough antioxidant to counterbalance the higher intake of polyunsaturated fatty acids (PUFA), the concentration of vitamin E was increased above mouse requirements (73 mg/kg vs 60 mg/kg) in the 3 diets.

Much evidence have shown that cell-mediated immunity is markedly compromised in burn patients and in burn animal models (40-43). However, the effect of dietary lipids on these T-cell functions after burn injury has not been studied. To measure splenocyte competence, we investigated the proliferative response induced by Con-A, a polyclonal stimulus involving macrophages, B- and T-cells. To further elaborate the T-cell response, we also stimulated the cells with anti-TcR mAb that requires accessory cells to provide help only as passive co-stimulators through macrophages and B-cells via B-7 (CD80) antigen (44). The B-cell response was evaluated with the mitogen LPS. The results of stimulation by these 3 different mitogens revealed that burn injury induced an inhibited proliferative response only in animals that had received the HF and SD diets. The intensity of suppression of the spleen cell proliferative response was more pronounced when burned animals were fed the HF diet while it was milder with the SD diet. The results of the proliferative response confirmed that the state of immunosuppression after burn injury impacted all lymphocytes but, as revealed by the use of mitogenic anti-TcR mAb, the T-cell population was mainly affected (27,39-43). This study clearly demonstrates that the administration of a LF diet immediately after burn injury abolishes the subsequent impairment of the splenocyte proliferative response to mitogens. These results confirm that increasing dietary fat inhibits several lymphocyte responses.

The mechanisms by which thermal injury induces an immunosuppressed state appear to be complex, involving cyclooxygenase activity and the production of PGE<sub>2</sub> (21-23,45,46), glucocorticoids (47), T suppressor cells (40,41,43,47), and suppression of T-cell function (47,48). NO acts as a vasodilator, a neurotransmitter, and represents an important factor against microbes and tumor cells (49). However, NO also has the ability to suppress lymphocyte function and can thus modulate the normal immune response (26). Previous results show that NO levels are increased in animal models of burn injury as well as in human burn victims (50-52). It has also been suggested that NO production by splenocytes from burned animals can suppress proliferative responses to Con-A (26,42). The latter studies point to spleen macrophages as the main NO producers in normal and burned animals. Since the use of NOS inhibitor abrogates

thermal injury-induced suppression of spleen cell proliferation in response to mitogenic stimuli, it has been proposed that NO production represents a major inhibitor of immune cells after burn injury. Our results showed a similar parallel with NO production and the decrease of splenocyte proliferation in animals fed the HF diet. A likely explanation for these observations would be that the intensity of the inflammatory response and/or the oxidative stress induced by the quantity of dietary lipids are important mediators of immunosuppression after thermal injury via their capacity to prime spleen cells.

Like iNOS, COX-2, an isoform of cyclooxygenase, is inducible in macrophages by pro-inflammatory agents (33). Recent results indicate that macrophages from burned mice display an altered sensitivity to PGE<sub>2</sub>, resulting in enhanced iNOS activity (53). The authors concluded that an elevation of PGE<sub>2</sub> after thermal injury can directly suppress T-cell function, and may also contribute to immune dysfunction through the enhancement of macrophage iNOS activity (53). It is well accepted that one of the host responses to thermal injury is massive synthesis and release of arachidonic acid metabolites (prostaglandins, leukotrienes, thromboxanes) which have profound immunomodulatory properties (45). The increase in PGE<sub>2</sub> found in each group given the HF diet after Con-A-stimulation compared to those on the LF diet support the fact that an excess of dietary lipids induced the cyclooxygenase. However this difference seem to be specific to this stimuli since we observed no change after LPS activation. Like others (54), the results from PGE<sub>2</sub> and NO production after T cells stimulation with Con-A showed an association between those two parameters and the immunosuppression following burn injury. Interestingly with LPS stimulation this explanation can not be applied. However those results can be explained by the fact that the inhibitory effects of PGE<sub>2</sub> on T-cell proliferation can only partially elucidate the immunosuppressive effects after a burn injury and other factors (like oxidative stress) are needed to exerce a significative immunosuppression. Indeed with the LF diet, the absence of immunosuppression despite elevated values of PGE<sub>2</sub> could be attributes to the fact that no other immunosuppressive factors are presented in these mice. Considering the PGE<sub>2</sub> production by macrophages stimulated with LPS, our results showed a markedly increase after burn injury with SD and HF diets. In the LF diet group however, we can

not discriminate if the enhancement of PGE<sub>2</sub> production between buprenorphine and burned mice was due to burn injury or the surgery itself. Overall the results from LPS stimulation confirm that macrophages from burned mice fed SD and HD diets display an increased amount of PGE<sub>2</sub> and NO. Further studies will be needed to elucidate the implicated mechanism. Our results suggest that the administration of a LF diet after thermal insult prevents the metabolic alterations that are responsible for immune impairment by its actions on the inflammatory response, at least partially through its effects on the PGE<sub>2</sub> and iNOS pathways.

A reduction of T-lymphocyte numbers, with or without a diminished CD4/CD8 cell ratio, has been associated with immunosuppression in the early post-burn period among patients and animals (45). Lederer et al. (55) found no evident change in the CD4/CD8 ratio of CD3<sup>+</sup> cells in the thymus, lymph nodes or spleen in a mouse model of burn injury. Schwacha et al. (56) obtained similar results in splenocytes isolated from mice 7 days after a 25% BSA burn injury. In the present study, we also noted an unchanged CD4/CD8 ratio in burned animal fed the SD or HF diets despite a significant decrease in the absolute number of these subsets. Interestingly, burned animals given the LF diet presented a significant increase in their CD4/CD8 ratio compared to buprenorphine and control animals. The change in CD4/CD8 ratio was due to a decrease of the CD8 population. These results emphasize recent observations demonstrating that changes in T-cell reactivity in burn patients affect CD8 rather than CD4 cells in producing T<sub>H</sub>2 cytokines profile (57). Moreover, since CD8<sup>+</sup> T-cells can have immunosuppressive effects after a burn injury through the polarization toward a T<sub>H</sub>2-driven immune response (57,58), this finding suggests that the reduction of these cells is associated with recovery of the response. However we can not exclude the possibility that a low fat diet has beneficial effect on the CD4<sup>+</sup> T-cell and their cytokines that result in an improvement of the immunosuppression subsequent to burn injury. Considering that animals fed the SD and the HF diet had higher PGE<sub>2</sub> and/or NO production associated with the inhibited proliferative response and a relative increase of CD8 subsets compared to the LF group, the immunosuppression observed in these groups could be of multifactorial origin. We can postulate that dietary lipids play an important role in

induction of the suppressed state after thermal injury through modulation of the inflammatory response that increases the suppressive activity of T-cells.

Burn injury leads to both oxygen radical-induced cell dysfunction and impaired cellular energetics (59). The degree of oxidative injury depends on the oxidant involved and the balance between oxidants released and antioxidant activity. Dietary fat is one factor that may contribute to elevated levels of oxidants in cells (60). Fats can be readily oxidized, leading to the production of reactive oxygen species. These reactions can easily propagate and modify lipids and proteins. Accumulation of the hepatic end-product of lipid peroxidation, MDA, has been shown to have a significant correlation with inflammatory gene activation (56). As we observed previously, no increase of lipid peroxidation products was found after burn injury in C3H/HeN mice (normally-responding strain) despite an increase noted in C3H/HeJ mice (endotoxin-resistant strain). Heightened antioxidant activity that counterbalances burn-induced oxidation could explain these results and differences between strains. Interestingly, and supporting our hypothesis, we noted marked differences between the MDA level in animals fed the LF diet compared to those kept on the other 2 diets. These results demonstrate that administration of a LF diet drastically reduced lipid peroxidation in the liver while a SD diet containing only 5% of fat considerably increased the accumulation of this hepatic diene. A moderate or excessive amount of dietary lipids induced similar effects on hepatic lipid peroxidation and, consequently, participated in comparable ways in oxidative stress. Although animals on the SD and HF diets had similar levels of MDA, only burned animals fed with HF diet showed an increase of spleen thiol concentrations. The probe used for thiol measurements is able to conjugate low molecular weight sulfhydryls, among which glutathione is the most abundant, thereby producing a fluorescent product. The increase in total thiols could be due either to a rise in esterase activity and/or an augmentation of glutathione concentrations present when oxidative stress occurs. The thiol results suggest that antioxidant activity rises in burned animals on the HF diet, although it appears that in these mice, this activity is not enough to attenuate liver peroxidation. The data on animals fed the SD diet indicate that this strain of mice incurs no increase of oxidative stress defense after burn injury.

Burn injury and the associated oxidative stress trigger several types of cellular responses to decrease the severity of this effect. We found an increase in the metabolic activity of spleen cells in burned animals fed the HF diet but not in animals fed the SD diet. The latter effect was associated with an elevation of thiols, as we have reported with C3H/HeJ mice (27). The increase of these 2 latter parameters suggests a more intense inflammatory response and oxidative stress in animals given the HF diet after thermal injury. Both groups (buprenorphine and burned) that received the LF diet also showed a slight but significant increase of their spleen cell metabolic activity. However, we failed to correlate this effect with an increase of the oxidative stress response. In general, the dietary studies indicate that diets rich in n-6 PUFA (such as soybean, corn, sunflower, and safflower oils) suppress the Con-A- or PHA-stimulated proliferation of spleen lymphocytes *ex vivo* compared with diets rich in saturated fatty acids, such as lard, tallow or hydrogenated coconut oil, or low-fat diets (37,61-64). The results vary, depending on differences in experimental conditions, such as the level of fat fed (in % of weight or in % of total calories), the duration of feeding, the anatomical site of origin of lymphocytes, and the species and strain of animal used (14). A recent study reported a decrease in the Con-A and phytohemagglutinin response of splenocytes from mice fed for 10 weeks diets containing 20% (by weight) of either oil with saturated or polyunsaturated fatty acids compared to mice receiving a LF diet (2% fat by weight) (65). Thus, the type of fat (PUFA vs saturated) used in a diet is determinant of immune competence only when the total amount of fat is at a normal or low level. Above a certain concentration of dietary fat, quantity has more influence than quality. This phenomenon is also observed in burned animals. In burned animals receiving 10% as total calories from lipid, beneficial effects on nitrogen balance, energy expenditure and immune parameters were observed with the administration of fish oil (eicosapentaenoic acid) (15) or structured lipid (38). In contrast, the unique protein-sparing actions usually associated with structured triglyceride administration are not seen when they are provided as 50% of non-protein calories (66).

In summary, the results presented in this study show that the administration of diets containing 11% of calories (SD diet) as fat and 45% of calories as fat (HF diet) had

adverse effects on immune functions after burn injury. The SD diet that contained 11% of total calories as fat induced an immunosuppression state in our burn model while the HF diet containing 45% energy as fat had profound immunosuppressive and oxidative stress properties. These discrepancies can be explained by different metabolic pathways used when different amounts of dietary lipids are ingested. Indeed, it is well-known that burn injury itself induces an increase of lipolysis as well as of free radical and PGE<sub>2</sub> production (38). The higher level of free radicals can promote lipid peroxidation, causing cellular damage that increases oxidative stress. The study shows that administration of diets containing more than 11% of total calories as dietary fat is detrimental in a mouse burn model. Although the type of fat administered could affect the immune response, it seems that above a certain level of fat, total quantity has more influence. The immunosuppressive properties of lipid metabolites and the induction of profound oxidative stress seem to explain the adverse effects of high-lipid diets after burn injury. We showed that the administration of a LF diet sufficient to prevent essential fatty acid deficiency improved immune functions and prevented excessive induction of oxidative stress after burn injury.

**Acknowledgments.** We thank A. De Oliveira and C. Hamelin for their excellent technical assistance, M. DaSilva for his revision of this manuscript and M. Dumont for statistical analysis.



## References

1. Harris BH, Gelfand JA. The immune response to trauma. *Sem. Pediatr. Surg.* **4**, 77-82, 1995.
2. Moran K, Munster AM. Alterations of the host defense mechanism in burned patients. *Surg. Clin. North. Am.* **67**, 47-55, 1987.
3. Wolfe RR. Relation of metabolic studies to clinical nutrition – the example of burn injury. *Am. J. Clin. Nutr.* **64**, 800-808, 1996.
4. Cunningham JJ, Hegarty MT, Meara PA, Burke JF. Measured and predicted calorie requirements of adults during recovery from severe burn trauma. *Am. J. Clin. Nutr.* **49**, 404-408, 1989.
5. Wolfe JH, Wu AV, O'Conner NH, et al. Anergy, immunosuppressive serum and impaired lymphocyte blastogenesis in burn patients. *Arch. Surg.* **117**, 1266-1271, 1982.
6. Montegut WJ, Lowry SF. Nutrition in burn patients. *Sem. Nephrol.* **13**(4), 400-408, 1993.
7. Alexander JW, Gottschlich MM. Nutritional immunomodulation in burn patients. *Crit. Care Med.* **18**(2), S149-S153, 1990.
8. Garrel DR, Davignon I, Lopez D. Length of care in patients with severe burns with or without enteral nutritional support: a retrospective study. *J. Burn Care Rehab.* **12**, 85-90, 1991.
9. Chiarelli A, Enzi G, Casadei A, et al. Very early nutrition supplementation in burned patients. *Am. J. Clin. Nutr.* **51**, 1035-1039, 1990.
10. Shils ME, Olson JA, Shike M. Nutrition and immunity In: *Modern Nutrition in Health and Disease*, 8th ed. Philadelphia: Lea & Fabiger, 47-83, 1994.
11. Wan M-F, Teo TC, Babayan VK, Blackburn GL. Invited comment: Lipids and the development of immune dysfunction and infection. *JPEN.* **12**(6), 43S-52S, 1988.
12. Kelley DS, Daudu PA. Fat intake and immune response. *Progr. Food Nutr. Sci.* **17**, 41-63, 1993.

13. Jeffery NM, Cortina M, Newsholme EA, Calder PC. Effects of variations in the proportions of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in the rat diet on spleen lymphocyte functions. *Br. J. Nutr.* **77**, 805-823, 1997.
14. Calder PC. Fatty acids, dietary lipids and lymphocyte functions. *Biochem. Soc. Transaction.* **23**(2), 302-309, 1995.
15. Alexander JW, Saito H, Ogle CK, Trocki O. The importance of lipid type in the diet after a burn injury. *Ann. Surg.* **204**, 1-8, 1986.
16. Mochizuki H, Trocki O, Dominioni L, et al. Optimal lipid content for enteral diets following thermal injury. *JPEN.* **8**, 638-646, 1984.
17. Nirgiotis JG, Hennersey PJ, Black CT, Andressy RH. Low-fat, high carbohydrate diets improve wound healing and increase protein levels in surgically stressed rats. *J. Pediatr. Surg.* **26**, 925-929, 1991.
18. Garrel DR, Razi M, Larivière F, et al. Improved clinical status and length of care with low-fat nutrition support in burn patient. *JPEN.* **19**(6), 482-491, 1995.
19. Bernier J, Jobin N, Emptoz-Bonneton A, et al. Decreased corticosteroid-binding globulin in burn patients: relationship with interleukin-6 and fat in nutritional support. *Crit. Care Med.* **26**(3), 452-460, 1998.
20. Jobin N, Garrel DR, Bernier J. Increased serum-soluble interleukin-2 receptor in burn patients: characterization and effects on the immune system. *Hum. Immunol.* **61**(3), 233-246, 2000.
21. Hansbrough J, Peterson V, Zapata-Servent R, Claman HN. Postburn immunosuppression in an animal model. II. Restoration of cell-mediated immunity by immunomodulating drugs. *Surgery.* **93**(3), 290-296, 1984.
22. Latter DA, Tchervenkov JI, Nohr CV, Christou NV. The effect of indomethacin on burn-induced immunosuppression. *J. Surg. Res.* **43**(3), 246-252, 1987.
23. Wood JJ, Grbic JT, Rodrick ML, Mannick JA. Suppression of interleukin 2 production in an animal model of thermal injury is related to prostaglandin synthesis. *Arch. Surg.* **122**(2), 179-184, 1987.
24. Gadd MA, Hansbrough J. Postburn suppression of murine lymphocyte and neutrophil functions is not reversed by prostaglandin blockade. *J. Surg. Res.* **48**(1), 84-90, 1990.

25. Mathieu J, Masson I, Chancerelle Y, and et al. Restoration of postburn impaired lymphocyte responsiveness by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is independent of prostaglandin E2 inhibition. *J. Leukocyte Biol.* **55**(1), 64-72, 1994.
26. Masson I, Mathieu J, Nolland XB, et al. Role of nitric oxide in depressed lymphoproliferative responses and altered cytokine production following thermal injury in rats. *Cell. Immunol.* **186**, 121-132, 1998.
27. Jobin N, Garrel DR, Bernier J. Increased burn-induced immunosuppression in LPS-resistant mice. *Cell. Immunol.* **200**(2), 65-75, 2000.
28. Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostases and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* **169**(5), 1543-1555, 1989.
29. Hedley DW, Chow S. Evaluation of methods for measuring cellular glutathione content using flow cytometry. *Cytometry.* **15**, 349-358, 1994.
30. Chen LB. Mitochondrial membrane potential in living cells. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **4**, 155-181, 1988.
31. Mills CD. Molecular basis of "suppressor" macrophages. Arginine metabolism via the nitric oxide synthetase pathway. *J. Immunol.* **146**, 2719-2723, 1991.
32. Hietanen E, Bartsch H, Ahotupa M, et al. Mechanisms of fat-related modulation of M-nitrosodiethylamine-induced tumors in rats: organ distribution, blood lipids, enzyme and pro-oxidant state. *Carcinogenesis.* **12**, 591-600, 1991.
33. Tetsuka T, Daphna-Iken D, Srivastava SK, et al. Cross-talk between cyclooxygenase and nitric oxide pathways: prostaglandin E2 negatively modulates induction of nitric oxide synthase by Interleukin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 12168-12172, 1994.
34. O'Sullivan SI, O'Connor TPF. Immunosuppression following thermal injury: the pathogenesis of immunodysfunction. *Br. J. Plastic. Surg.* **30**, 615-623, 1997.
35. Wilmore DW, Aulick LH. Systemic response to injury and the healing wound. *JPEN.* **4**, 147-151, 1980.
36. Chandra RK. Nutrition and the immune system. *Proc. Nutr. Soc.* **52**, 77-84, 1993.
37. Kinsella JE, Lokesh B. Dietary lipids, eicosanoids, and the immune system. *Crit. Care. Med.* **18**(2), S94-S113, 1990.

38. Selleck KJ, Wan JM, Gollaher CJ, et al. Effects of low and high amounts of a structured lipid containing oil on protein metabolism in enterally fed burned rats. *Am. J. Clin. Nutr.* **60**(2), 216-222, 1994.
39. Clarke HE, Coates ME, Eva JK, et al. Dietary standards for laboratory animals: report of the Laboratory Animals Center Diets Advisory Committee. *Laboratory Animals.* **11**, 1-28, 1977.
40. Youn YK, Lalonde C, Demlking R. The role of mediators in the response to thermal injury. *World. J. Surg.* **16**, 30-36, 1992.
41. Barlow YT. Lymphocytes and immunosuppression in the burned patient: a review. *Burns.* **20**, 487-490, 1994.
42. Schwacha MG, Somers SD. Thermal injury-induced immunosuppression in mice: the role of macrophage-derived reactive nitrogen intermediates. *J. Leukocyte Biol.* **63**, 51-58, 1998.
43. Faist E, Schinkel C, Simmer S. Update on the mechanisms of immune suppression of injury and immune modulation. *World. J. Surg.* **20**, 454-459, 1996.
44. Jenkins MK, Mueller D, Schwartz RH, et al. Induction and maintenance of anergy in mature T-cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **292**, 167-176, 1991.
45. Ninnemann JL, Stockland AE. Participation of prostaglandin E in immunosuppression following thermal injury. *J. Trauma.* **24**, 201-207, 1984.
46. Yang L, Hau B. The role of macrophage (M $\phi$ ) and PGE-2 in postburn immunosuppression. *Burns.* **18**, 132-136, 1992.
47. Sparkes BG. Immunological responses to thermal injury. *Burns.* **23**, 106-117, 1997.
48. Horgan AF, Mendez MV, O'Riordain DS, et al. Altered gene transcription after burn injury results in depressed T-lymphocyte activation. *Ann. Surg.* **220**, 342-351, 1994.
49. Nathan CF, Hibbs JB, Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* **3**, 65-70, 1991.
50. Becker WK, Shippee RL, McManus AT, et al. Kinetics of nitrogen oxide production following experimental thermal injury in rats. *J. Trauma.* **34**, 855-862, 1993.
51. Carter EA, Derojas-Walker T, Tamir S, et al. Nitric oxide production is intensely and persistently increased in tissue by thermal injury. *Biochem. J.* **304**, 201-204, 1994.

52. Preiser J, Reper P, Vlasselaer D, et al. Nitric oxide production is increased in patients after burn injury. *J. Trauma*. **40**, 368-371, 1996.
53. Schwacha MG, Samy TS, Catania R.A, Chaudry IH. Thermal injury alters macrophage response to prostaglandin E2: contribution to the enhancement of inducible nitric oxide activity. *J. Leukoc. Biol.* **64**(6), 740-746, 1998.
54. Bamberger T, Masson I, Mathieu J, et al. Nitric oxide mediates the depression of lymphoproliferative response following burn injury in rats. *Biomed. Pharmacother.* **46**, 495-500, 1992.
55. Lederer JA, Rodrick ML, Mannick, JA. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock*. **11**(3), 153-159, 1999.
56. Schwacha MG, Ayala A, Cioffi WG, et al. Role of protein kinase C in cyclic AMP-mediated suppression of T-lymphocyte activation following burn injury. *Biochem. Biophys. Acta*. **1455**, 45-53, 1999.
57. Zedler S, Bone RC, Baue AE, et al. T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns. *Crit. Care Med.* **27**, 66-72, 1999.
58. Zedler S, Faist E, Ostermeier B, et al. Postburn constitutional changes in T-cell reactivity occur in CD8+ rather than in CD4+ cells. *J. Trauma*. **42**, 872-880, 1997.
59. Lalonde C, Nayak U, Hennigan J, Demling R. Antioxidants prevent the cellular deficit produced in response to burn injury. *J. Burn Care Rehab.* **17**, 379-383, 1996.
60. Djuric Z, Kritschinsky D. Modulation of oxidative DNA damage levels by dietary fat and calories. *Mutation Res.* **295**, 181-190, 1993.
61. Gershwin ME, Beach RS, Hurley LS. Nutrition and Immunity. Orlando, FL: Academic Press, 1985.
62. Newbern PM. Dietary fat, immunological response, and cancer in rats. *Cancer Res.* **41**, 3783-3785, 1981.
63. Locniskar M, Nauss KM, Newberne PM. The effect of quality and quantity of dietary fat on the immune system. *J. Nutr.* **113**(5), 951-961, 1983.
64. Kramer TR, Briske-Anderson M, Johnson SB, Holman RT. Influence of reduced food intake on polyunsaturated fatty acid metabolism in zinc-deficient rats. *J. Nutr.* **114**(7), 1224-1230, 1984.

65. Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. The effect of dietary lipid manipulation on rat lymphocyte subset and proliferation. *Immunology*. **82**(4), 603-610, 1994 .
66. Gollaher CJ, Swenson ES, Mascioli EA, et al. Dietary fat level as determinant of protein-sparing actions of structured triglycerides. *Nutrition*. **8**(5), 348-353, 1992.

## **TABLES ET GRAPHIQUES**

Table 1: Chow composition

<b>Content (% of weight)</b>	<b>Low-fat diet</b>	<b>Standard-diet</b>	<b>High-fat diet</b>
	<b>(1%)</b>	<b>(5%)</b>	<b>(25%)</b>
<b>Vitamin-free casein</b>	21.0	21.0	21.0
<b>Sucrose</b>	57.7	25.0	25.0
<b>Solka floc.</b>	3.0	3.0	3.0
<b>Dextrin</b>	10.0	38.7	18.7
<b>RP vitamin mix</b>	2.0	2.0	2.0
<b>Vitamin E ( UI / kg)</b>	66	66	66
<b>RP mineral mix # 10</b>	5.0	5.0	5.0
<b>DL-methionine</b>	0.2	0.2	0.2
<b>Corn oil</b>	1.0	2.5	12.5
<b>Lard</b>	-	2.5	12.5
<b>Choline chloride</b>	0.2	0.2	0.2
<b>Kcal / 100 g</b>	375	397	497



**Table 2:** Cumulative chow intake during 10 days post-injury

	DIETS		
	Low-fat (1%) g <sup>1</sup>	Standard (5%) g <sup>1</sup>	High-fat (25%) g <sup>1</sup>
Controls (n = 15)	207.8 (78 kcal / d) <sup>2</sup>	194.6 (77 kcal / d)	196.2 (97 kcal / d)
Buprenorphine (n = 15)	183.8 (69 kcal / d)	178.5 (72 kcal / d)	181.8 (90 kcal / d)
Burned (n = 15)	228.3 (86 kcal / d)	244.6 (97 kcal / d)	181.4 (90 kcal / d)

Results are expressed for the control, buprenorphine and burn group on the 3 experimental diets.

<sup>1</sup> Cumulative chow intakes represent 5 mice housed per cage.

<sup>2</sup> Caloric intake per day by 5 mice housed per cage.

**Table 3:** Mean change in weight

	Mean weight change (g) <sup>1</sup>		
	<b>DIETS</b>		
	<b>Low-fat (1%)</b>	<b>Standard (5%)</b>	<b>High-fat (25%)</b>
Control (n = 15)	0.77 ± 0.50	-0.71 ± 0.58	2.26 ± 0.71
Buprenorphine (n = 15)	-1.30 ± 0.58 <sup>ff</sup>	-1.54 ± 0.13	0.33 ± 0.25 <sup>ff</sup>
Burned (n = 15)	0.04 ± 0.25 <sup>**</sup>	-1.02 ± 0.31	-0.65 ± 0.67

<sup>1</sup> Mean weight change: mean weight change (±SEM) 10 days post-injury minus weight on the experimental day. N=5 for each group.

<sup>ff</sup> p<0.01 for the buprenorphine group compared to the controls

<sup>\*\*</sup> p<0.01 for the burn group compared to the buprenorphine group.

**Table 4:** NO and PGE2 production by spleen cells from control, buprenorphine and burn mice fed 3 experimental diets, after 66 h of stimulation with Con-A or LP

DIETS						
CON-A	Low fat (1%)		Standard (5%)		High fat (25%)	
	PGE <sub>2</sub> (pg/ml)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μM)	PGE <sub>2</sub> (pg/ml)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μM)	PGE <sub>2</sub> (pg/ml)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μM)
Controls	207 ± 40	48 ± 17	184 ± 11	50 ± 14	1407 ± 154	32 ± 4
Buprenorphine	448 ± 118 <sup>f</sup>	49 ± 18	NA	48 ± 15	1537 ± 45	55 ± 22
Burned	471 ± 223 <sup>f</sup>	77 ± 17	2252 ± 1284 <sup>ff</sup>	82 ± 26	1754 ± 148 <sup>f</sup>	116 ± 35 <sup>**ff</sup>
LPS	Low fat (1%)		Standard (5%)		High fat (25%)	
	PGE <sub>2</sub> (pg/ml)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μM)	PGE <sub>2</sub> (pg/ml)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μM)	PGE <sub>2</sub> (pg/ml)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μM)
Controls	313 ± 44	37 ± 11	214 ± 8	23 ± 3	529 ± 28	15 ± 3
Buprenorphine	2182 ± 684 <sup>ff</sup>	NA	NA	19 ± 4	339 ± 126	23 ± 10
Burned	2969 ± 747 <sup>ff</sup>	36 ± 17	7443 ± 872 <sup>ff</sup>	55 ± 19 <sup>**ff</sup>	2314 ± 270 <sup>**ff</sup>	49 ± 12 <sup>*ff</sup>

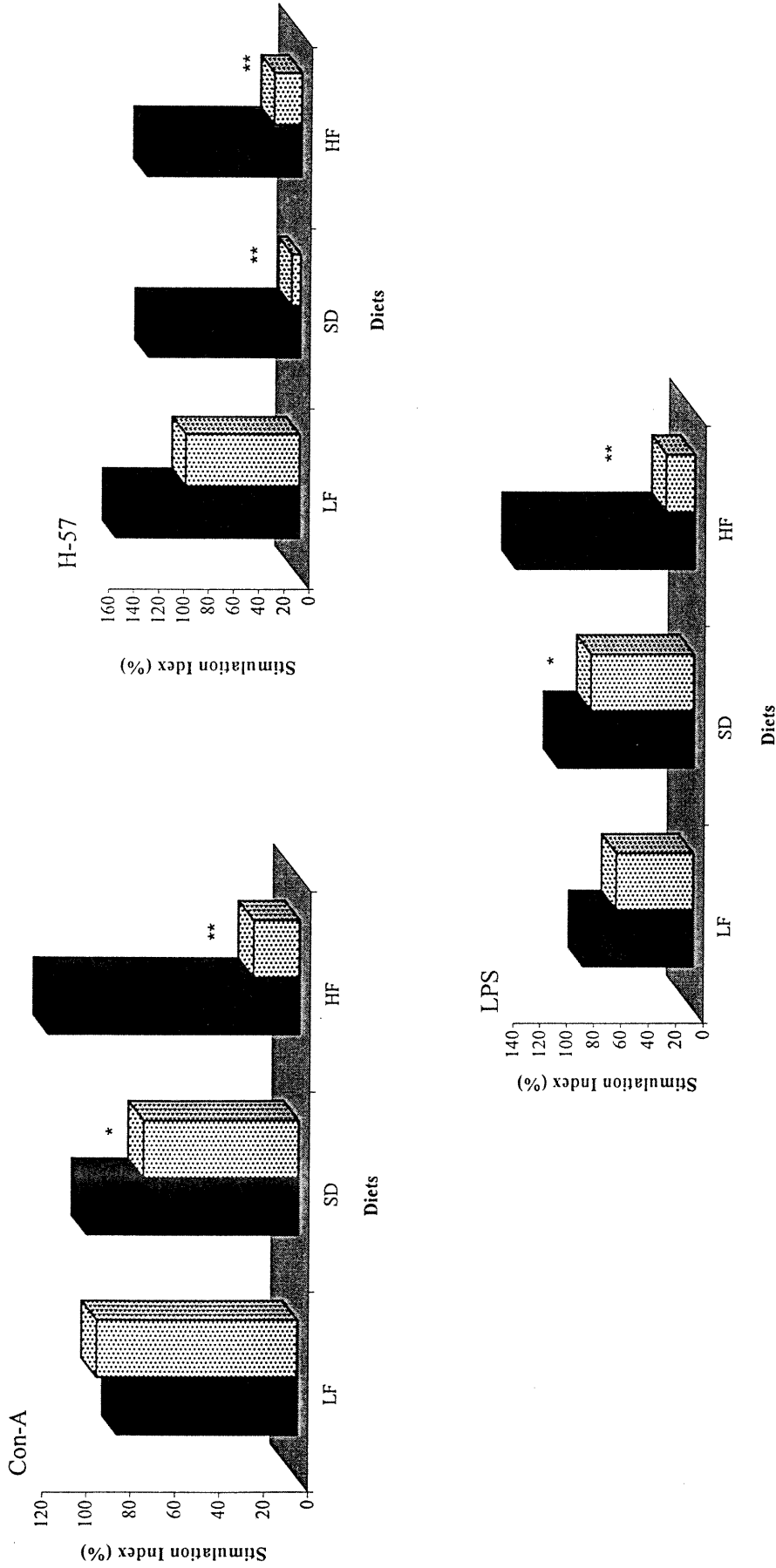
Note: Spleen cells from control, buprenorphine and burned mice (5 per group) fed LF, SD or HF diets were cultured (2 x 10<sup>5</sup> cells/well in triplicate) in the presence of Con-A (1 μg/ml) or LPS (50 μg/ml). Culture supernatants were assayed for NO<sub>2</sub><sup>-</sup> with Griess reagent and for PGE<sub>2</sub> by ELISA. Results are expressed as mean ± SEM of 5 animals per group. NA: Data non-available \* p<0.05 and \*\* p<0.01 for burned animals compared to buprenorphine. <sup>f</sup> p <0.05 and <sup>ff</sup> p<0.01 for burned or buprenorphine animals compared to controls

**Table 5:** Spleen analysis of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells after burn injury: Helper / inducer (CD4) and suppressor / cytotoxic (CD8) cell subsets 10 days after burn injury

	DIETS								
	Low-fat (1%)			Standard (5%)			High-fat (25%)		
	CD4 (%)	CD8 (%)	CD4/CD8	CD4 (%)	CD8 (%)	CD4/CD8	CD4 (%)	CD8 (%)	CD4/CD8
Controls	22.3 ± 1.3	10.6 ± 0.9	2.1 ± 0.1	23.9 ± 2.2	9.8 ± 0.5	2.4 ± 0.1	23.2 ± 2.3	8.7 ± 0.6	2.6 ± 0.2
Buprenorphine	22.1 ± 1.5	8.8 ± 0.9	2.6 ± 0.1 <sup>‡</sup>	17.8 ± 1.4 <sup>‡</sup>	7.4 ± 0.6 <sup>‡</sup>	2.4 ± 0.1	21.8 ± 1.3	8.9 ± 0.5	2.4 ± 0.1
Burned	15.2 ± 0.7 <sup>**</sup>	5.2 ± 0.2 <sup>**</sup>	3.0 ± 0.1 <sup>*</sup>	15.6 ± 0.8 <sup>‡</sup>	7.0 ± 0.2 <sup>‡</sup>	2.2 ± 0.1	15.2 ± 0.2 <sup>**</sup>	5.8 ± 0.3 <sup>**</sup>	2.7 ± 0.1

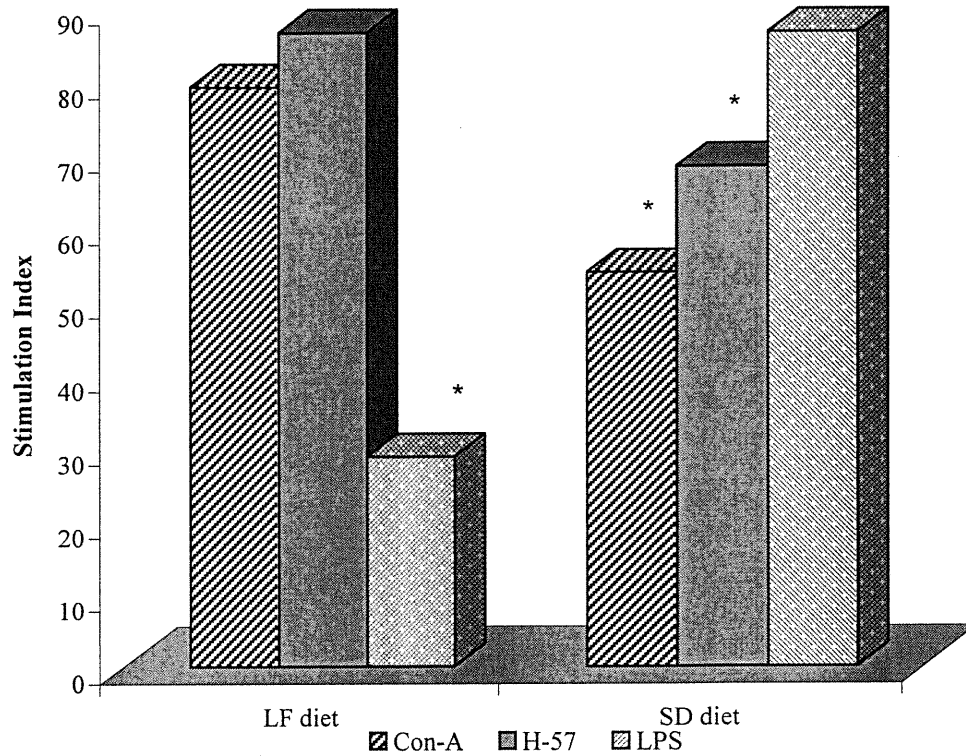
Splenocytes were stained for the expression of CD3, CD4, CD8. CD3<sup>+</sup> cells were gated in the lymphocyte population and the proportions of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> were determined. Each result was obtained from 5 mice per group and is representative of 2 experiments. Results are expressed as mean ± SEM. \* p < 0.05 and \*\* p < 0.01 for the burn group compared to buprenorphine<sup>‡</sup> p < 0.05 for the buprenorphine or burn group compared to the controls.

**Figure 1.** Administration of a LF diet prevented the decrease of mitogen-stimulated splenocytes after thermal injury.



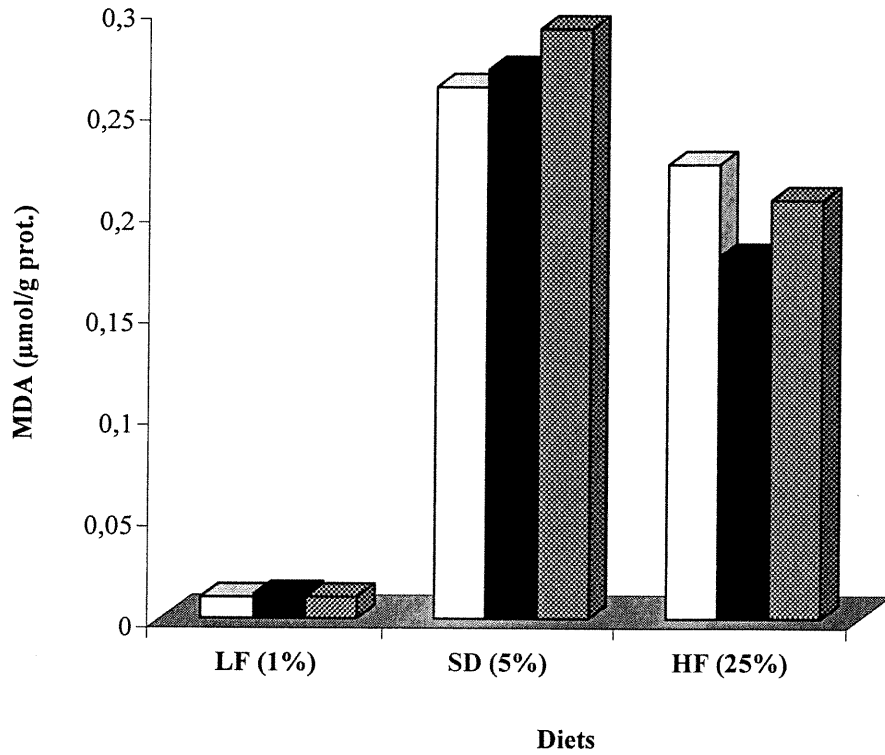
The splenocyte response to Con-A, H-57 and LPS stimulation in animals that received the 1% fat diet (LF), the 5% fat diet (SD) or the 25% fat diet (HF) was measured 10 days after burn or sham injury. Control group being considered as 100%, stimulation index that compare buprenorphine-sham burn mice to control mice (solid bars) and buprenorphine burned mice to buprenorphine-sham burn mice (hatched bars) are presented. Splenocytes were collected from 5 mice per group. Individual mice splenocytes ( $2 \times 10^5$  cells/well) were stimulated in triplicate with Con-A ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), anti-TcR antibody ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) or LPS ( $50 \mu\text{g/ml}$ ). Plates were incubated under standard conditions for 66 h and pulsed for an additional 6 h with  $[^3\text{H}]$ -thymidine. The results represent the mean value of stimulation index calculated for each group ( $n=5$  animals per group). \*  $p<0.05$  and \*\*  $p<0.01$  for burn vs buprenorphine-treated mice.

**Figure 2.** Administration of a LF diet had a beneficial effect on splenocyte proliferation 4 days after thermal injury.



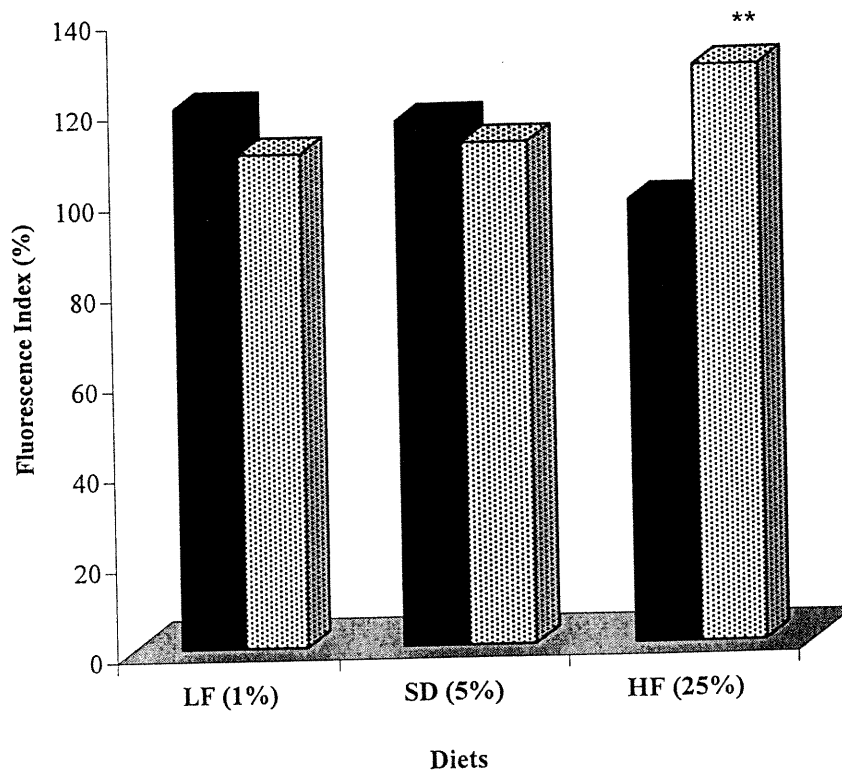
The splenocyte response to Con A, H-57, and LPS stimulation in animals that received the 1% fat diet (LF) or the standard diet (SD) was measured 4 days after the burn or sham injury. The stimulation index that compares buprenorphine burn mice to buprenorphine sham burn mice is presented. Splens were collected from five mice per group. Individual mouse splenocytes ( $2 \times 10^6$  cells/wells) were stimulated in triplicate with on A ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), anti-TcR antibody ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), or LPS ( $50 \mu\text{g/ml}$ ). Plates were incubated under standard conditions for 66 h and pulsed for an additional 6 h with [ $^3\text{H}$ ]thymidine. The results represent the mean value of the stimulation index calculated for the burned group ( $n=5$  animals). \*  $p < 0,05$  for burn vs buprenorphine treated mice.

**Figure 3.** LF diet-fed animals showed a decrease in concentration of liver malonaldehyde (MDA) 10 days post-burn injury.



Lipid peroxidation product concentrations were assessed in animals fed the 1% fat diet (LF), the 5% fat diet (SD) or the 25% fat diet (HF) 10 days after burn or sham injury. Liver sections from 5 animals per group were homogenized individually. Protein content of each sample was determined by protein assay and MDA concentrations were determined at 586 nm of absorbance. The test sensitivity is 0.1 nmol/ml. The results are presented as mean MDA concentration per g of protein content in 5 animals per group. MDA concentrations are shown in the control group (empty bars), buprenorphine group (solid bars) and the burn group (hatched bars).

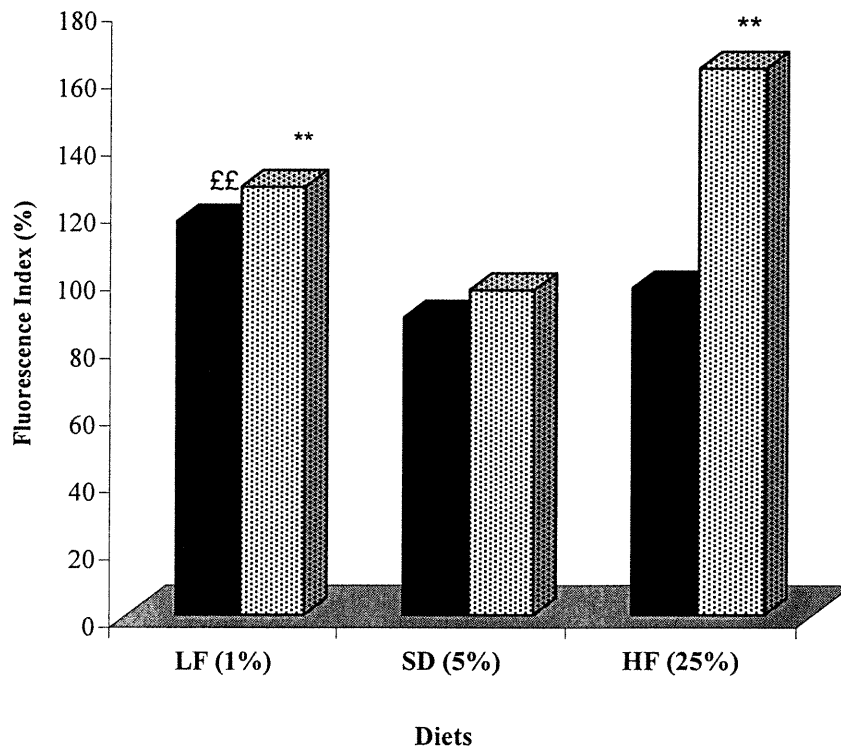
**Figure 4.** Administration of a HF diet (25% fat) induced higher spleen thiol concentrations in burned animals.



Thiol concentrations in the spleen were measured with a CMFDA probe that represents an index of glutathione concentration in animals fed a 1% fat diet (LF), 5% fat diet (SD) or 25% fat diet (HF) for 10 days after sham or burn injury. Splenocyte suspensions from each animal (5 per group) were adjusted to a concentration of  $5 \times 10^6$  cell/ml. These suspensions and the CMFDA probe ( $5 \mu\text{M}$ ) were incubated for 10 min at  $37^\circ\text{C}$  in a humidified atmosphere with 5%  $\text{CO}_2$ . Luminescent signals were recorded by flow cytometry. The results are presented as an index of fluorescence buprenorphine-sham burn compared to control animals (solid bars) and buprenorphine-burn to buprenorphine-sham burn (hatched bars). Control group being considered as 100% of fluorescence. \*\*  $p < 0.01$  for burn vs buprenorphine-treated mice.



**Figure 5.** Increased mitochondrial activity in burned-animals fed a 25% fat diet (HF).



Mitochondrial activity was measured in animals fed a 1% fat diet (LF), 5% fat diet (SD) or 25% fat diet (HF) for days after sham or burn injury. Splenocyte suspensions from each animal (5 per group) were adjusted to a concentration of  $5 \times 10^6$  cells/ml. These suspensions and rhodamine 123 ( $10 \mu\text{M}$ ) were incubated for 30 min at  $37^\circ\text{C}$  in a humidified atmosphere with 5%  $\text{CO}_2$  and immediately analyzed by cytometry. The results are presented as an index of fluorescence: buprenorphine-sham burn compared to control animals (solid bars) and buprenorphine-burn to buprenorphine-sham burn (hatched bars). Control group being considered as 100% of fluorescence. \*\*  $p < 0.01$  for burn vs buprenorphine-treated mice and ££  $p < 0.01$  for buprenorphine-sham burn vs control mice.

## **CONCLUSIONS**

## 2. CONCLUSION DU TROISIÈME ARTICLE

En résumé, cette étude démontre et confirme que l'administration de grandes quantités de lipides ont des effets délétères sur le système immunitaire après une brûlure. Plus spécifiquement nous avons montré pour la première fois que des diètes contenant plus de 11% des calories totales sous forme de lipides exacerbent les fonctions du système immunitaire après une brûlure. Les propriétés immunosuppressives des métabolites des lipides, de même que l'induction du stress oxydatif semblent expliquer les effets adverses des diètes riches en lipides après une brûlure. En contre partie, un apport minimum en lipides réduit et prévient ces effets sous-jacents à la brûlure.

## **VI. DISCUSSION**

## **1. Interleukine-2 récepteur soluble : effets sur la réponse inflammatoire et immunitaire après une brûlure**

Une brûlure sévère induit une réponse inflammatoire systémique qui inclue une augmentation de la production des cytokines inflammatoires. Le  $\text{TNF}\alpha$  et l'IL-1, produits principalement par les monocytes ou les macrophages activés, sont les principaux médiateurs de la réponse inflammatoire et sont responsables des chocs septiques (430,431). Ces cytokines inflammatoires engendrent la production d'une seconde vague de cytokines comprenant l'IL-6 et l'IL-8 (431).  $\text{TNF}\alpha$  et l'IL-1 peuvent exercer leurs activités sous une forme associée aux cellules ou sous une forme soluble tandis, que l'IL-6 existe seulement sous une forme soluble. L'IL-6 remplit donc une fonction dite endocrine. Par conséquent, l'IL-6 circulant est un meilleur indicateur de la réponse inflammatoire que les autres cytokines. Les patients brûlés présentent de fortes concentrations d'IL-6 en circulation et, la présence d'épisodes infectieux est étroitement associée aux concentrations plasmatiques de cette cytokine (47,95,432-436). Par contre, suite à une infection ou un traumatisme, l'IL-2 est rarement détectée dans le sérum. En fait, plusieurs études ont montré une diminution immédiate des taux sériques d'IL-2 après un traumatisme (142,187,437,438). Rappelons que l'IL-2 est considérée comme une cytokine immunostimulatrice qui est produite par les lymphocytes activés. Plusieurs fonctions bénéfiques sont associées à l'IL-2 dont celles d'augmenter le taux de survie des animaux brûlés (439), d'activer les lymphocytes à détruire des cellules tumorales (440) et de stimuler la sécrétion de  $\text{TNF}\alpha$  et d'IL-1 (441). Ainsi, plusieurs ont suggéré qu'une production inadéquate d'IL-2 soit responsable, du moins en partie, de l'immunosuppression après une brûlure (186-188).

Il a récemment été montré, qu'après un traumatisme, la production des cytokines inflammatoires était accompagnée d'une sécrétion séquentielle de récepteurs solubles ou de récepteurs antagonistes de ces cytokines (87). Les récepteurs solubles du  $\text{TNF}\alpha$  et le récepteur antagoniste de l'IL-1 sont produits dans les premières heures post-traumatiques. Viens en suite la production du récepteur soluble alpha de l'IL-2 qui

continue d'augmenter pendant plusieurs jours. La production immédiate et séquentielle dans le sérum des patients de ces récepteurs solubles et antagonistes semble faire partie intégrante d'une réponse physiologique organisée face à un traumatisme sévère. Ce phénomène suggère également que les récepteurs solubles et antagonistes des cytokines puisse jouer un rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire et immunitaire (87). Le rôle précis de ces récepteurs est encore mal compris. Toutefois, des concentrations plus élevées de ces récepteurs chez les non-survivants suggèrent que ces molécules soient des marqueurs de la sévérité du traumatisme. Ils pourraient également être le reflet de fortes concentrations tissulaires des cytokines traduisant ainsi la présence d'un stress sévère, d'une inflammation ou des dommages tissulaires chez les patients. De fortes concentrations d'IL-2Rs ont été observées dans plusieurs conditions pathologiques inflammatoires (442-445) et elles ont été associées à un mauvais pronostic chez les patients atteints du SIDA, de brûlure et de sepsis (198,199,446,447). Connaissant l'importance de l'IL-2 dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire et sachant que cette réponse est affaiblie après une brûlure sévère, nous avons voulu explorer le rôle et l'implication du récepteur soluble de cette cytokine après une brûlure. De plus, une précédente étude effectuée dans notre laboratoire a montré les effets bénéfiques de l'administration d'une diète faible en lipides sur l'état clinique, infectieux et inflammatoire des patients sévèrement brûlés (29,37) Ainsi, nous avons voulu vérifier les effets de l'administration d'une diète faible en lipides sur les concentrations d'IL-2Rs et, déterminer ainsi la relation entre la présence du IL-2Rs et le syndrome inflammatoire post-brûlure.

Plusieurs ont rapporté la présence de l'IL-2Rs après un traumatisme (87,198,446-448). Toutefois, après une brûlure, sa forme exacte était jusqu'à maintenant indéterminée et son rôle biologique mal compris. Les études de Teodorczyk-Injeyan ont montré que les grandes concentrations d'IL-2Rs présentes dans le sérum de patients brûlés pourraient interférer avec les fonctions immunitaires dépendantes de l'IL-2 suggérant que ce récepteur soit médiateur de l'immunosuppression après une brûlure (446,449). D'autres résultats de la même équipe suggèrent également que l'augmentation des concentrations d'IL-2Rs soit causée par une activation des cellules T due à une production excessive

d'auto antigènes dans le sang et d'un besoin de contre-régulation de la réponse immunitaire dépendante de l'IL-2. Toutefois, cette hypothèse reste à être vérifiée. L'originalité de la première étude présentée dans cette thèse réside dans la détermination de la forme du récepteur soluble à l'interleukine-2 présente chez les patients brûlés : la forme soluble de ce récepteur est une forme tronquée de la portion extracellulaire du récepteur cellulaire de l'IL-2. La forme tronquée de l'IL-2R avait déjà été déterminée dans d'autres pathologies mais, jusqu'à présent, la population des brûlés n'avait jamais été étudiée à cet effet. Cette étude nous a également permis de confirmer une augmentation des concentrations de l'IL-2Rs dans le sérum de patients brûlés (2922 pg/ml vs 124 pg/ml pour des sujets sains). De telles concentrations de IL-2Rs ont été associées à un mauvais pronostic et à la présence d'une immunosuppression (446,447). Toutefois, en montrant que l'inhibition de la prolifération des cellules d'origine humaine ne pouvait pas être directement attribuable à la présence de l'IL-2Rs, ces résultats confirment la présence de d'autres facteurs solubles présents dans le sérum de patients brûlés qui seraient responsables de l'inhibition de la prolifération des cellules. Par conséquent, l'immunosuppression associée à la présence de l'IL-2Rs s'expliquerait par un autre mécanisme que celui-ci. L'utilisation d'une forme purifiée d'IL-2Rs a permis de déterminer son influence sur plusieurs paramètres de la réponse immunitaire impliquant l'IL-2. Les résultats montrent clairement que l'IL-2Rs ne compétitionne pas avec la forme du récepteur de haute affinité exprimée à la surface des cellules pour se lier avec l'IL-2. Par contre, les fonctions médiées par l'IL-2 impliquant les cellules exprimant le récepteur d'affinité intermédiaire peuvent être perturbées en présence d'un excès d'IL-2Rs. En effet, nous avons montré l'augmentation de l'activité des cellules NK par l'IL-2 était inhibé en présence d'un excès d'IL-2Rs. D'ailleurs, une diminution de l'activité de ces cellules a été remarquée dans plusieurs pathologies présentant de fortes concentrations d'IL-2Rs (450,451). Les résultats de la présente étude suggère que le rôle de l'IL-2Rs recombinant en tant antagoniste de l'IL-2 pour la prolifération des cellules T soit improbable. Les résultats de différents laboratoires concernant les effets de l'IL-2Rs sur la prolifération cellulaire sont controversés. La divergence de ces résultats pourrait être expliquée par le fait que l'IL-2Rs circulant représente un groupe de protéines multimériques plutôt qu'une composante homogène

(452). En effet, la formation du complexe de haute affinité incluant les chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , sur le récepteur soluble, peut compétitionner avec les récepteurs membranaires exprimés par les cellules immunitaires. Ainsi, nous avons montré une diminution de l'activité basale des cellules non-stimulées en présence de l'IL-2Rs, et que cette inhibition était rétablie avec l'ajout d'IL-2 exogène. Or, sachant que les récepteurs de haute affinité sont absents sur les lymphocytes non activés, il est possible que de faibles quantités d'IL-2Rs puissent diminuer l'activité basale des lymphocytes ou des monocytes en se liant avec la faible quantité d'IL-2 produite par les populations de monocytes circulants.

L'analyse du phénotypage a montré une diminution de l'expression des molécules du CMH de classe II à la surface des cellules non T et des cellules CD11b<sup>+</sup> des patients brûlés, et un lien entre l'expression des molécules DR et la présence de l'IL-2Rs a également été trouvé. En effet, les patients brûlés qui présentaient de faibles quantités d'IL-2Rs n'ont pas cette baisse associée de l'expression des molécules CMH de classe II. De plus, il est intéressant de noter que la protéine responsable de la transcription des gènes du CMH de classe II serait également requise pour l'expression des gènes constitutifs et inductible de l'INF- $\gamma$  (453). Ainsi, cette diminution des molécules du CMH de classe II peut être liée, du moins en partie, à la baisse de production de l'INF- $\gamma$ . A cet effet, il est intéressant de noter que, comme d'autres équipes, nous avons observé une dissociation entre la présence de l'IL-2Rs et la production de l'INF- $\gamma$  (454,455) (figure 3 du 1<sup>er</sup> article). De plus, nous avons montré que de fortes concentrations de IL-2Rs peuvent lier l'IL-2 et diminuer ainsi la concentration de cette cytokine. Ainsi ces 2 phénomènes appuient l'hypothèse qui veut que les populations T<sub>H</sub>2 soient privilégiées après une brûlure mais ils suggèrent également la participation de l'IL-2Rs dans l'équilibre des cellules T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>2. Ainsi, les concentrations élevées d'IL-2Rs après une brûlure sévère pourraient être associées à la production prédominante de cytokines reliée aux cellules de type T<sub>H</sub>2. Conséquemment de cette façon, de fortes concentrations d'IL-2Rs pourraient contribuer indirectement à l'immunosuppression après une brûlure. Finalement, l'ensemble des résultats démontre clairement que la présence de l'IL-2Rs ne peut expliquer la dysfonction des cellules T des patients brûlés. Toutefois, certaines



modifications des paramètres immunitaires peuvent être affectées par la présence de fortes concentrations d'IL-2Rs.

La valeur pronostique attribuées aux concentrations d'IL-2Rs est appuyée par le fait que les patients décédés ont des valeurs de IL-2Rs significativement plus élevées que les survivants. De façon générale, la présence de l'IL-2Rs a été associée à une activation du système immunitaire, notamment des cellules T. Cependant dans la présente étude, l'absence de marqueurs d'activation à la surface des cellules mononuclées périphériques de patients traumatisés, n'appuie pas cette hypothèse. La probabilité qu'une réponse locale des cellules T génère de telles quantités d'IL-2Rs dans le sérum est très faible. Or, plusieurs études ont rapporté que les monocytes/macrophages, les lymphocytes B et les cellules neuronales, gliales et pituitaires peuvent également exprimer le IL-2Rs à leur surface et pourraient expliquer la présence de ce récepteur dans le sérum de patients brûlés (445,450,451,456,457). Ces cellules pourraient donc être responsables de sa présence dans le sérum de patients traumatisés. De récents résultats ayant montré que les taux d'IL-2Rs augmentent dans les premières suivant le traumatisme et ce, avant même qu'une augmentation de l'IL-2 soit détectable, indiquent qu'une activation des cellules T ne peut pas être responsable de la présence de l'IL-2Rs (87). Ainsi, ces résultats suggèrent que la production ou la libération massive de ce récepteur ait lieu dans d'autres tissus qui expriment de façon constitutive de récepteur. D'autres études sont nécessaires pour déterminer la source exacte d'IL-2Rs après un traumatisme.

Des taux élevés de IL-2Rs ont également été observés dans plusieurs conditions cliniques inflammatoires (arthrite rhumatoïde et maladies inflammatoires de l'intestin) (442,443). Ainsi, nous avons voulu déterminer l'implication de ce récepteur dans le syndrome inflammatoire post-brûlure. Généralement, il est admis que les concentrations d'interleukine-6 circulantes reflètent l'intensité de l'inflammation (83). Suite à une brûlure sévère, les patients présentent des taux élevés d'IL-6 (47,96). Or, nous avons démontré que l'administration d'une diète faible en lipides diminue les taux circulants d'IL-6 suite à une brûlure, suggérant ainsi une réponse inflammatoire plus faible chez ces patients (37, annexe II). Des résultats similaires ont été obtenus avec l'observation

des concentrations d'IL-2Rs : les patients ayant reçu une diète contrôle (30% des calories sous forme de lipides) présentaient des concentrations d'IL-2Rs significativement plus élevées que ceux qui ont reçu une diète faible en lipides (15 %) (4187 pg/ml vs 1657 pg/ml, respectivement) (figure 4 du 1<sup>er</sup> article). D'ailleurs, une corrélation positive entre les taux d'IL-6 et ceux d'IL-2Rs, observée également dans d'autres pathologies inflammatoires (458,459), a été trouvée chez ces patients brûlés. Ces résultats suggèrent qu'une réduction des apports en lipides du support nutritionnel après une brûlure sévère diminue l'intensité de la réponse inflammatoire post-brûlure. En réalité, il faut mentionner que l'effet des lipides de la diète n'est pas immédiat sur les médiateurs de l'inflammation. En effet, tant pour les concentrations d'IL-6, d'IL-2rs que pour celles de la CBG, la différence entre les groupes contrôle et faible en gras est significativement différente seulement après le 13<sup>e</sup> jour post-brûlure (37, annexe II). Ainsi on peut supposer qu'au moins dix jours de support nutritionnel est nécessaire avant que les effets modulateurs aient des répercussions sur les médiateurs systémiques. Toutefois, les effets modulateurs de la diète sur l'activité des cellules immunitaires précèdent certainement le rétablissement des composantes systémiques. Une baisse de l'activité des monocytes/macrophages pourrait expliquer ces effets modulateurs d'une diète faible en lipides. En effet, il est bien connu que l'induction d'une réponse inflammatoire systémique, subséquente à la brûlure, entraîne l'activation des monocytes/macrophages (460) et qu'une production rapide de médiateurs inflammatoires, incluant les élastases, découle de cette activation. Par conséquent une diminution de l'activité initiale des monocytes pourrait expliquer le rétablissement subséquent des concentrations des médiateurs inflammatoires à la suite de l'administration d'une diète faible en lipides. Ainsi, une diminution de l'activité des monocytes expliquerait la réduction de la production des cytokines inflammatoires, notamment dans ce cas-ci, de l'IL-6. Mais comment expliquer la baisse concomitante de l'IL-2Rs? L'hypothèse la plus plausible réside dans le fait qu'une diminution de l'activité des monocytes engendre également une diminution des produits sécrétés par ces cellules : PGE<sub>2</sub>, élastases, protéases, radicaux libres, cytokines. Sachant que l'origine de l'IL-2Rs présente chez les brûlés provient d'un clivage protéolytique du domaine extracellulaire du récepteur de l'IL-2 à la surface des cellules, on peut supposer

qu'une baisse de la production des métallo protéases, par les neutrophiles activés, soit responsable de la diminution des concentrations de l'IL-2Rs chez les patients nourris avec une diète en lipides. Cette hypothèse n'a cependant pas été vérifiée. On ne connaît pas encore la nature exacte des enzymes qui clivent le domaine extracellulaire du récepteur membranaire de l'IL-2 pour former l'IL-2Rs mais l'implication des élastases est possible étant donné que ces dernières expriment des récepteurs pour différentes cytokines à leur surface (460). Ainsi, en réduisant la réponse inflammatoire, les lipides de la diète seraient responsables de cette baisse de la production et/ou sécrétion de protéases. Ce même phénomène expliquerait également le rétablissement des valeurs de CBG au 13<sup>e</sup> jour post-brûlure car rappelons que la CBG est un substrat de choix pour les élastases (31). Ainsi, la chute rapide de CBG dès les premiers jours suivant le traumatisme pourrait être causée par l'activité initiale des élastases de même que par les activités inhibitrices de l'IL-6 sur cette protéine (37); les effets anti-inflammatoires obtenus avec l'administration d'une diète faible en lipides rétabliraient ces valeurs par la suite. Des mesures de l'activité des protéases sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse. Toutefois, l'hypothèse d'une diminution de la synthèse de CBG après une brûlure ne peut être exclue et devrait faire l'objet de recherches futures. De plus, il serait intéressant d'établir une courbe cinétique de l'activité des monocytes/macrophages après la brûlure et de déterminer précisément à quel moment les effets modulateurs d'une diète faible en lipides sont effectifs.

## **2. Effet de la réponse inflammatoire sur les réponses immunitaire et oxydative suite à une brûlure**

Les études effectuées chez les patients du Centre des Grands Brûlés de l'Hôtel-Dieu de Montréal, ont montré qu'une baisse de la réponse inflammatoire induite par une réduction des lipides de l'alimentation améliorerait le statut clinique, nutritionnel et infectieux de ces patients (24,29,37). Or, même si une diminution de la réponse inflammatoire semble bénéfique, nous connaissons mal le rôle de cette dernière sur la réponse du système immunitaire et la réponse oxydative post-brûlure. Une hyper

production de cytokines inflammatoire et une stimulation excessive des cellules immunitaires pendant la réponse inflammatoire sont des mécanismes potentiellement responsables de l'immunosuppression (460,461). De plus, les cytokines pro-inflammatoire et les endotoxines produites après une brûlure provoquent des dommages cellulaires qui mènent à la production de radicaux libres causant ainsi un stress oxydatif, phénomène pouvant également participer à l'immunosuppression (462,463). Ainsi, d'après ces énoncés, il semble que l'intensité de la réponse inflammatoire soit un élément important pour déterminer l'amplitude de l'immunosuppression subséquente. De récentes évidences suggèrent que l'immunosuppression sous-jacente à un traumatisme sévère soit, en fait, une réponse anti-inflammatoire compensatrice en réponse à un stimulus inflammatoire initial. En effet selon ces études, la réponse initiale des cellules T suite à un traumatisme sévère serait une réponse pro-inflammatoire induite par les cellules  $T_H1$  et la réponse de type  $T_H2$ , observée plusieurs jours après la blessure dans les modèles expérimentaux et cliniques, ferait parti d'un phénomène compensatoire anti-inflammatoire (144,146,151). À l'aide d'un modèle animal, nous avons voulu déterminer l'implication de la réponse inflammatoire induite par la lipopolysaccharide sur la prolifération des cellules immunitaires et sur le stress oxydatif secondaire à une lésion thermique. Pour ce faire, nous avons utilisé deux lignées de souris : la première de type congénique (C3H/HeJ) possède une mutation génétique qui lui permet d'être résistante aux effets immunostimulateurs et pathophysiologiques du lipide A, une composante des endotoxines de la lipopolysaccharide (LPS) tandis que la seconde lignée, la lignée-mère, (C3H/HeN) répond normalement à ce puissant agent inflammatoire. Dans ce travail une étude de cinétique a été faite afin de déterminer, dans notre modèle, le moment où l'immunosuppression post-brûlure était maximale. De plus, l'utilisation d'un opiacé chez les animaux a permis d'évaluer l'implication de ce dernier sur certains paramètres immunitaires et oxydatifs étudiés dans cette étude. Étant donné l'utilisation courante de cette famille d'analgésiques après une brûlure sévère, ces données permettaient, pour la première fois, d'établir l'implication de la buprénorphine dans la réponse du système immunitaire post-brûlure.

En utilisant un opiacé pour soulager la douleur des animaux, notre modèle est ainsi similaire à la situation clinique des patients qui en reçoivent de grandes quantités durant leur séjour à l'hôpital. La méthode de brûlure et l'utilisation de la buprénorphine a permis l'établissement d'un modèle à l'intérieur duquel la mortalité post-brûlure est inexistante et la douleur causée aux animaux est réduite à son minimum. Ainsi, la croissance et l'alimentation des animaux étaient normales, éliminant ainsi l'établissement d'un état de malnutrition qui pouvait influencer le système immunitaire (tableau 1 et 2 du 2<sup>ème</sup> article). Des données cliniques et expérimentales suggèrent que les opioïdes endogènes et exogènes possèdent des propriétés immunosuppressives (464,465). Considérant la quantité de ces drogues administrée aux patients brûlés, ces effets inhibiteurs pourraient jouer un rôle dans l'immunosuppression subséquente à une brûlure. Toutefois, les effets sur la réponse immunitaire diffèrent selon le type d'opioïdes utilisés. Il a été montré que l'administration de fortes doses de buprénorphine, comparativement à la morphine, n'affecte pas l'activité des cellules NK (466). En étudiant la capacité proliférative des splénocytes de souris, nous avons démontré pour la première fois que l'administration continue de buprénorphine n'a pas d'effet inhibiteur sur ces cellules. Une étude comparative des effets de la morphine et de la buprénorphine sur les fonctions du système immunitaire a récemment confirmé ces résultats : les fonctions des cellules NK de la rate, les cellules T et les fonctions des macrophages ne sont aucunement affectés par l'administration de buprénorphine tandis que l'administration d'une dose équivalente de morphine entraîne des effets suppressifs sur toutes les fonctions de ces cellules (467). Nous avons montré, dans un modèle expérimental de brûlure, que la buprénorphine n'affecte pas les fonctions immunitaires. Ainsi la douleur post-brûlure des animaux peut être soulagée sans interférer avec la réponse du système immunitaire.

Suite à la lésion thermique recouvrant 20% de la surface corporelle, les animaux ont été sacrifiés aux jours 1, 4, 7, 10 et 14 post-brûlure. La prolifération des cellules de la rate et des paramètres du stress oxydatif ont été étudiés à chacun de ces jours. Malgré le grand nombre d'études démontrant les altérations des fonctions des cellules T après une brûlure (468,469), les mécanismes sous-jacents à cette immunosuppression sont encore

mal compris. À cet effet, pour vérifier l'implication de la réponse inflammatoire sur l'état d'immunosuppression, les cellules provenant des souris des 2 lignées ont été stimulées avec différents mitogènes. De façon générale les résultats ont montré, chez les souris de la lignée-mère, l'établissement d'une dépression biphasique de la prolifération des splénocytes entre le jour 4 et 10 post-brûlure. La présence d'une immunosuppression biphasique au quatrième et au dixième jour post-brûlure a également été observée chez le rat (225,470). En accord avec les résultats de d'autres laboratoires (188,471), nous avons démontré que l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T de souris femelles est maximale au dixième jour (figure 1 et 2 du 2<sup>ème</sup> article). L'utilisation d'un anticorps dirigé contre le TcR, a permis de démontrer que l'immunosuppression sous-jacente à une brûlure affecte tous les lymphocytes mais, les lymphocytes T représentent la population de cellules la plus affectée. Les souris résistantes à la LPS ont montré une suppression de la prolifération des splénocytes plus prononcée et plus persistante que celle des souris de la lignée contrôle. En effet, la prolifération des cellules de souris résistantes est fortement inhibée à partir du 7<sup>ème</sup> jour post-brûlure et cette inhibition persiste jusqu'au jour 14 tandis que chez les souris HeN, la réponse proliférative des splénocytes revient à la normale au jour 14, après une inhibition maximale au jour 10. Le rétablissement, au jour 14, d'un ratio normal de CD4/CD8 pourrait expliquer l'augmentation, au même jour, de la prolifération des splénocytes chez les souris HeN (472). Par contre, à l'opposé, la baisse absolue des sous-populations de cellules observée aux autres jours ne peut expliquer l'immunosuppression des souris.

Contrairement aux souris de la lignée contrôle, les souris résistantes à la LPS présentent une augmentation significative, au jour 4, de la prolifération des splénocytes stimulés avec la Con-A. La Con-A est un agent mitogénique des cellules T mais, étant un mitogène polyclonal, il peut se lier également à des glycolipides exprimés sur d'autres cellules comme les lymphocytes B et les macrophages (473). Des récentes évidences ont démontré que l'activité des macrophages contribue à la suppression des fonctions des lymphocytes T après une brûlure (101,224). L'hyper activation des macrophages engendre une production excessive de facteurs immunosuppresseurs (PGE<sub>2</sub>, NO, etc) et

peuvent ainsi participer à l'immunosuppression. De cette façon, l'hyper activation observée au jour 4 chez les souris résistantes pourrait être responsable de l'inhibition de la prolifération des lymphocytes survenant dans les jours suivants. L'équipe de Lederer (144) a récemment démontré que le traumatisme de la brûlure augmente la force de la stimulation des cellules immunitaires. L'utilisation d'un super antigène a permis de montrer que la brûlure amplifie la production de cytokines en réponse à ce dernier, induisant un choc inflammatoire léthal chez les animaux. Cette étude démontre clairement que la brûlure active le système immunitaire et que l'activation des cellules T par un super antigène amplifie ce phénomène. En amplifiant la réponse systémique inflammatoire déjà initiée par la brûlure, cette activation peut être fatale pour l'organisme. Les résultats de d'autres études appuient les effets néfastes d'une hyper activation du système immunitaire après une brûlure (474-477).

Cette étude montre que l'inflammation due aux LPS des bactéries a un effet bénéfique pour le système immunitaire des animaux brûlés. Ainsi, contrairement aux croyances, l'inflammation est plutôt favorable pour le système immunitaire

L'immunosuppression prononcée et soutenue retrouvée chez les souris résistantes à la LPS pourrait également être expliquée par la faible capacité de ces souris à produire naturellement de l'IFN- $\gamma$  (478). Ainsi, accentuée par la brûlure, la diminution de la production de l'IFN- $\gamma$  favoriserait chez ces souris la production de cytokine de type T<sub>H</sub>2 et expliquerait en partie l'immunosuppression subséquente. Ces données, ajoutées à celles observées dans le premier article (IL-2Rs), appuient la prédominance des cytokines produites par les cellules T<sub>H</sub>2 et leurs activités immunosuppressives. Les dosages intracellulaires de ces cytokines après une brûlure seront nécessaires afin de justifier ce mécanisme d'action. Cependant, plusieurs d'études vont dans ce sens et supportent cette hypothèse en montrant qu'une brûlure sévère induit un changement dans la réponse des cytokines qui favorise le phénotype immunosuppresseur T<sub>H</sub>2 (160,472). Les résultats suggèrent que l'établissement d'une faible réponse inflammatoire à la LPS après une brûlure sévère, amplifie l'immunosuppression subséquente. À l'opposé, l'induction d'une réponse inflammatoire normale après une brûlure semble être nécessaire pour le rétablissement de la capacité proliférative des splénocytes. Toutefois, comme on peut le

remarquer, la présence d'une réponse inflammatoire ne prévient pas complètement l'état d'immunosuppression sous-jacente à une brûlure.

Les paramètres du stress oxydatif étudiés dans cette étude démontrent de façon convainquante que les souris résistantes à la LPS présentent un stress oxydatif plus prononcé que la lignée de souris normales après une brûlure (figures 3, 4, 5 de l'article 2). En effet, contrairement au souris répondant normalement à la LPS, les souris résistantes ont montré une augmentation significative des taux de malonaldehyde (MDA) hépatique au dixième jour post-brûlure de même qu'une élévation concomitante de la concentration de thiols totaux dans la rate (figure 3 et 5). L'absence d'un effet brûlure sur les taux des MDA chez la lignée de souris normale suggère la mise en place d'un mécanisme compensatoire antioxydant. Cette explication est appuyée par l'augmentation des thiols totaux au jour 4 post-brûlure. L'augmentation des thiols chez les souris résistantes suggère également la présence de ce mécanisme compensatoire mais l'activité antioxydante, dans ce cas-ci, n'est pas suffisante pour contrebalancer la peroxydation des lipides dans le foie. De plus chez les souris résistantes à la LPS, l'augmentation de l'activité métabolique des splénocytes, démontrée par le potentiel mitochondrial (figure 4), conjointement aux résultats de MDA et de thiols totaux suggèrent une activation de la réponse inflammatoire. De façon plus spécifique chez ces souris, les changements observés dans les paramètres de défense oxydatif indiquent qu'une augmentation des taux de thiols est associée avec une réponse de défense intensifiée pour lutter contre le stress oxydatif. L'augmentation du stress oxydatif chez ces souris pourrait représenter l'établissement d'une réponse inflammatoire alternative utilisée en absence d'une réponse normale aux endotoxines. La différence entre les niveaux d'oxydation des deux lignées serait reliée à l'activation des macrophages (101,224,479). Ainsi l'augmentation du stress oxydatif pourrait partiellement expliquer l'immunosuppression observée chez les souris résistantes à la LPS après une brûlure étant donné que ce phénomène est lié avec une augmentation de l'apoptose et de la production de cytokine pro-inflammatoires par les macrophages.



En résumé cette étude montre qu'une faible réponse inflammatoire induite par la LPS est associée à une immunosuppression prononcée et à la présence d'un stress oxydatif chez les souris. Ainsi, il semble que l'emprunt d'une voie alternative autre que celle de la LPS, soit néfaste pour le système immunitaire. En effet, en étant incapable de produire des cytokines inflammatoires (IL-1 et TNF) en réponse aux endotoxines, les macrophages des souris résistantes à la LPS semblent augmenter leurs activités de façon significative en guise de compensation. Or, il se trouve que cette augmentation de l'activité des cellules accessoires, reflétée par le haut taux de stress oxydatif, engendre une profonde anergie des cellules T. Ce modèle suggère qu'une réponse inflammatoire due aux LPS représente une voie importante et bénéfique pour le système immunitaire après une brûlure. Ainsi, par cette voie, le système immunitaire exercerait ses fonctions anti-infection après un stress thermique. À l'opposé, en contournant la réponse inflammatoire due à la LPS, les souris résistantes à la LPS montrent une élévation significative de l'activation des cellules accessoires qui est reflétée par l'augmentation du stress oxydatif. Cette hyper activation pourrait être responsable de l'anergie profonde et persistante des lymphocytes T retrouvée chez ces animaux. L'utilisation de ce modèle a montré que l'augmentation des niveaux de stress oxydatif, associée à la production de médiateurs inflammatoires et immunosuppresseurs, pourrait être impliqué dans l'immunosuppression sous-jacente à une brûlure sévère.

### **3. Effets de lipides de l'alimentation sur l'immunosuppression et le stress oxydatif associés à une brûlure**

La deuxième étude a démontré que l'intensité du stress oxydatif pourrait être responsable, du moins en partie, de l'immunosuppression subséquente à une brûlure. Ainsi avec la troisième et dernière étude, nous avons étudié l'effet du stress oxydatif induit par les lipides de l'alimentation sur les fonctions immunitaires après une brûlure. En effet, l'augmentation du stress oxydatif serait un des mécanismes importants par lequel les lipides de l'alimentation inhibent le système immunitaire (247,111). Tel que discuté précédemment, les lipides de l'alimentation ont la capacité de moduler plusieurs paramètres du système immunitaire (301,368,480). Plusieurs évidences suggèrent que les lipides de l'alimentation ne soient pas une source de calories efficaces après une brûlure et que certaines composantes des molécules lipidiques peuvent interférer avec plusieurs des fonctions immunitaires après une brûlure (247). Seulement deux études expérimentales ont montré que l'administration de solution entérale contenant de faibles quantités de lipides avait des effets bénéfiques après la brûlure (424,425). Toutefois, la cicatrisation, la préservation de la masse musculaire et l'état nutritionnel sont les seuls paramètres étudiés dans ces études. Ainsi, jusqu'à ce jour, aucune étude n'avait étudié le rôle des lipides de l'alimentation sur les fonctions du système immunitaire et sur le stress oxydatif après une brûlure. Ainsi, contenu de l'importance des résultats cliniques antérieurs que nous avons obtenu dans notre laboratoire, nous avons cru nécessaire d'examiner les effets spécifiques d'une diète faible en lipides sur les paramètres immunitaires et oxydatifs post-brûlure. L'utilisation de notre modèle animal était la méthode la plus appropriée pour l'étude de ce phénomène. Afin de pouvoir isoler l'effet du stress oxydatif induit par les lipides de la diète sur la réponse immunitaire post-brûlure, la lignée de souris présentant une réponse inflammatoire normale (C3H/HeN) a été choisie. Les animaux ont été sacrifiés au dixième jour post-brûlure, au moment où l'immunosuppression était maximale.

L'alimentation habituelle des souris est constituée d'une moulée qui contient 5% de lipides (11% des calories totales ou 14% des calories non-protéiques). Cette diète fut

utiliser comme diète contrôle. Afin d'intensifier les observations, nous avons choisi des valeurs extrêmes de lipides pour les diètes expérimentales, soit : une diète faible en lipides contenant 1% de lipides (2% des calories totales ou 3% des calories non-protéiques) et une diète riche en lipides avec 25% de lipides (45% calories totales et 54% des calories non-protéiques). La diète faible en lipides (huile de maïs) renfermait le minimum d'acide gras linoléique pour combler les besoins des souris en acides gras essentiels. Les deux autres diètes ont été faites à partir d'un mélange de gras polyinsaturés et saturés (huile de maïs et lard (1/2, 1/2)). Outre les lipides, le contenu en éléments nutritifs était identique pour les 3 diètes (table 1 de l'article 3). Toutefois, la concentration de vitamine E des 3 diètes a été augmentée afin de s'assurer que les souris nourries avec la diète riche en lipides reçoivent une quantité suffisante d'antioxydants. Les souris ont été nourries avec une de ces diètes pendant les 10 jours qui ont suivi la brûlure et elles ont été sacrifiées au jour 10, moment où l'immunosuppression est maximale. Une fois encore, le taux de survie des animaux a été de 100% avec notre modèle de brûlure et d'administration continue de buprénorphine. Les mêmes paramètres que ceux dans la deuxième étude ont été étudiés. Toutefois des mesures de production *in vitro* de PGE<sub>2</sub> et de NO ont été ajoutées.

De nombreuses évidences ont montré que la réponse immunitaire à médiation cellulaire est fortement compromise chez les patients et les animaux brûlés (24,468,481). Toutefois, les effets des lipides sur les fonctions de ces cellules T n'ont jamais été étudiés après une brûlure. Ainsi, la prolifération des splénocytes a été étudiée sous l'action de trois mitogènes différents (figure 1 de l'article 3). Pour chacune de ces trois conditions, les résultats démontrent que la brûlure induit une inhibition de la réponse proliférative seulement chez les animaux nourris avec les diètes contrôle ou riche en lipides. Toutefois, l'intensité de la suppression est plus prononcée chez le groupe riche en lipides comparativement aux souris nourries avec la diète contrôle. Comme nous l'avons montré dans l'étude précédente, les cellules T représentent la population de cellules la plus affectée après une brûlure (voir stimulation avec H-57). Remarquablement, l'administration d'une diète faible en lipides après une brûlure, prévient complètement l'inhibition de la prolifération cellulaire normalement rencontrée

au 10<sup>e</sup> jour post-brûlure. Ainsi, la quantité totale de gras semble être un facteur déterminant de l'immunosuppression subséquente à une brûlure. Tel que précédemment mentionné, les acides gras saturés et polyinsaturés de type oméga-6 sont les 2 familles d'acides gras ayant les moins grandes activités immunosuppressives (301). Or, nos diètes étant constituées d'un mélange de deux gras riches en ce type d'acides gras, ces résultats suggèrent que la quantité et non la qualité de lipides exercent des effets modulateurs sur le système immunitaire après une brûlure. Rappelons qu'en absence de stress physiologique, les études démontrent que la diète généralement offerte aux rongeurs qui contient 5% de lipides, n'est pas immunosuppressive (301,323-325). Or, après une brûlure, la diète 5% est inhibitrice. On peut donc supposer que les dommages causés par la lésion thermique exacerbent les effets délétères des lipides de la diète. Il est intéressant de noter que non seulement les souris brûlées nourries avec la diète 25% ont une profonde inhibition de la prolifération des splénocytes mais que les souris contrôles nourries avec cette même diète présentent également une diminution de la prolifération de base comparativement aux souris contrôles 5% (30 000 vs 100 000 cpm). Ainsi, ces observations appuient l'hypothèse voulant qu'une augmentation des lipides de la diète inhibent plusieurs des réponses des lymphocytes.

Tel que démontré par les figures 1A et 2A du 2<sup>e</sup> article, les souris présentent une inhibition de la prolifération aux jours 4 et 10. Ainsi nous avons voulu vérifier si les effets bénéfiques d'une diète faible en lipides surviennent dès les premiers jours post-brûlure. Étonnamment, l'administration d'une diète faible en lipides pendant les quatre premiers jours post-brûlure est suffisante pour prévenir l'inhibition de la prolifération des cellules stimulées avec la CON-A et le H-57 (figure 2 de l'article 3). Des changements dans les acides gras membranaires pourraient expliquer ces effets rapides. Généralement le temps minimum nécessaire pour observer des changements dans les acides gras membranaires chez des sujets normaux est d'environ 2 semaines (335). Chez les brûlés, le turn-over cellulaire étant plus rapide, les changements dans la composition membranaire peuvent avoir lieu plus tôt. Toutefois dans ce cas-ci, cette hypothèse est peu probable car la diète administrée aux animaux ne contenait pas des acides gras différents de ceux qui constituent normalement les membranes (acide w6).

Conséquemment, une baisse de la réponse inflammatoire serait l'hypothèse de choix pour expliquer les effets bénéfiques d'une diète faible en lipides.

Tel qu'observé dans la deuxième étude, le stress oxydatif pourrait être un des mécanismes responsables de l'immunosuppression après une brûlure. Ainsi, nous avons étudié les effets des lipides de l'alimentation sur l'induction du stress oxydatif post-brûlure. L'oxyde nitrique, produit par les macrophages activés, a la capacité de supprimer les fonctions des lymphocytes et peut donc moduler la réponse du système immunitaire (225). Des résultats ont également montré une augmentation des taux de NO chez les patients et les animaux brûlés (221-223). Il a même été suggéré que le NO produit par les splénocytes soit responsable, après une brûlure, de l'inhibition de la réponse proliférative des cellules stimulées avec la CON-A (224,225). Les résultats présentés à la table 4 de l'article 3 démontrent une augmentation de la production *in vitro* de NO après une brûlure mais seulement chez les animaux ayant été nourris avec les diètes 5 et 25%. La production de NO par les souris brûlées nourries avec la diète 1% n'est pas différente de celle des souris contrôles. Ainsi, les splénocytes des souris brûlées nourries avec les diètes 5 et 25% semblent être pré-activées (prime). Par conséquent on peut penser que l'intensité de la réponse inflammatoire et/ou du stress oxydatif induite par la quantité de lipides de l'alimentation serait un médiateur important de l'inflammation via sa capacité à pré-activer les cellules de la rate. Si cette hypothèse est vraie, nous devrions nous attendre à ce que la production de PGE<sub>2</sub> par les macrophages activés soit plus élevée avec les diètes 5 et 25%. En effet, tout comme le iNOS, la cyclooxygenase de classe 2 (Cox-2) est inductible, par les macrophages, sous l'action de stimuli inflammatoires (482). Une étude récente a indiqué que les macrophages de souris brûlées montrent une altération de la susceptibilité aux effets de PGE<sub>2</sub>, causant une augmentation de l'activité du iNOS (483). Les auteurs ont conclu que l'augmentation de PGE<sub>2</sub> après une brûlure serait directement responsable de l'inhibition des fonctions des cellules T, et qu'à travers l'augmentation de l'activité du iNOS des macrophages, ce phénomène pourrait également contribuer aux altérations du système immunitaire (483). Il est important de mentionner que les diètes expérimentales étaient exemptes de LPS. Les résultats de la production de PGE<sub>2</sub> varient selon le

stimulus utilisé. Une augmentation importante de PGE<sub>2</sub> dans les 3 groupes de souris nourries avec une diète riche en lipides suggère qu'un excès de lipides induit la cyclooxygénase des cellules stimulées avec la CON-A. Toutefois sous l'action de ce même mitogène, la brûlure n'a pas engendré d'augmentation de la production de PGE<sub>2</sub>. Par opposition, lors d'une stimulation avec LPS, la brûlure induit une augmentation de la concentration de PGE<sub>2</sub> chez les animaux nourris avec les diètes 5 et 25%. Dans le groupe 1%, l'effet brûlure se distingue difficilement de l'effet chirurgie (brûlé vs buprénorphine). De façon générale, les résultats montrent que les macrophages provenant de souris brûlées nourries avec les diètes 5 et 25% présentent une élévation des taux de PGE<sub>2</sub> et de NO. D'autres études sont nécessaires afin d'élucider ce mécanisme. Cependant, ces résultats suggèrent une fois de plus que les PGE<sub>2</sub> ne sont pas les seuls facteurs responsables de l'immunosuppression post-brûlure. Ainsi, on peut prétendre que de par son action sur la réponse inflammatoire, qui a lieu du moins en partie via ses effets sur les voies de PGE<sub>2</sub> et d'iNOS, l'administration d'une diète faible en lipides après une brûlure prévient les altérations métaboliques qui sont responsables des dysfonctions immunitaires. Encore une fois, il apparaît que l'hyper activation des macrophages après une brûlure serait responsable des dommages immunitaires et oxydatifs. Ainsi, la quantité de lipides administrée dans la diète jouerait un rôle fondamental à ce niveau, en prévenant ou en exacerbant les effets de la brûlure. Un dosage des concentrations de PGE<sub>2</sub> en circulation dans les premiers jours post-brûlure fournirait des arguments à cette hypothèse.

Le niveau de stress oxydatif hépatique après une brûlure a été mesuré par le dosage d'un métabolite de la peroxydation des lipides, le malonandéhyde (MDA) (figure 3 de l'article 3). Une augmentation des concentrations de MDA dans le foie a été corrélée avec une activation des gènes de l'inflammation (484). L'absence généralisée d'un effet brûlure trouvée dans cette étude confirme également ceux présentés dans l'étude précédente (figure 3A de l'article 2). Ainsi, une augmentation de l'activité antioxydante parallèlement au stress oxydatif causé par la brûlure pourrait expliquer ces résultats. Or, ces résultats supposent également que la quantité de vitamine E administrée aux souris était suffisante, et ce, même chez le groupe ayant reçu 25% de lipides. Toutefois, une

différence marquée a été notée entre les taux de MDA des animaux nourris avec la diète 1% comparativement à ceux des deux autres groupes. Ces résultats montrent que l'administration d'une diète faible en lipides réduit presque totalement la peroxydation des lipides dans le foie tandis qu'une diète contenant plus de 5% de lipides augmente considérablement l'accumulation de MDA hépatique. Ces résultats suggèrent que l'administration d'une diète faible en lipides réduit la quantité d'AGPI dans le foie au profit des AGS, ce qui expliquerait la diminution considérable de peroxydation hépatique. Ainsi, en induisant des taux comparables de MDA dans le foie, nous pouvons croire que l'administration d'une quantité modérée (5%) ou excessive (25%) de lipides dans l'alimentation, participe de façon similaire à l'induction du stress oxydatif. Ces résultats appuient notre hypothèse stipulant que les lipides de l'alimentation induisent un stress oxydatif important qui serait, en partie responsable, des altérations rencontrées dans les fonctions du système immunitaire. Malgré la similarité entre les taux de MDA entre les groupes 5 et 25 %, seuls les animaux brûlés nourris avec la diète 25% ont montré une augmentation des concentrations de thiols totaux dans la rate (figure 4 de l'article 3) suggérant l'augmentation d'une activité antioxydante compensatrice chez ces animaux. Toutefois, cette activité antioxydante ne semble pas suffisante pour prévenir ou réparer les dommages oxydatifs causés par la brûlure et la forte concentration de lipides dans la diète. De plus, l'élévation de l'activité métabolique des splénocytes (figure 5 de l'article 3) suggère la présence d'une réponse inflammatoire et d'un stress oxydatif plus intenses chez les animaux nourris avec la diète riche en lipides.

En résumé, cette étude montre que l'administration de grandes quantités de lipides ont des effets délétères sur le système immunitaire après une brûlure. Plus spécifiquement, nous avons montré pour la première fois que des diètes contenant plus de 11% des calories totales sous forme de lipides exacerbent les fonctions du système immunitaire après une brûlure. Les propriétés immunosuppressives des métabolites des lipides, de même que l'induction du stress oxydatif pourraient expliquer les effets adverses des diètes riches en lipides après une brûlure. En contre partie, un apport minimum en lipides réduit et prévient ces effets sous-jacents à la brûlure.

#### 4. INTERPRÉTATION GLOBALE ET CRITIQUE DES RÉSULTATS

L'ensemble des résultats présentés dans ce travail suggère que la réponse inflammatoire soit un facteur déterminant de l'état d'immunosuppression et du stress oxydatif subséquents à une brûlure sévère. La production massive de médiateurs inflammatoires, tels que IL-6, PG et radicaux libres, et leurs activités suppressives exercées sur plusieurs fonctions des cellules immunitaires supportent cet énoncé. Dans le premier article, l'intensité de la réponse inflammatoire des patients brûlés a été associée à la présence du récepteur soluble alpha de l'IL-2 qui est issu d'un clivage protéolytique de la forme cellulaire de ce récepteur. La source exacte de l'IL-2Rs est encore inconnue mais la production de protéases par les neutrophiles activés pourrait être responsable de la sécrétion de cette forme soluble du récepteur à l'IL-2 qui est exprimée sur plusieurs types de cellules (monocytes/macrophages, cellules B). Plusieurs auteurs ont suggéré que la présence de l'IL-2Rs soit associée à l'activation des lymphocytes T mais, toutefois dans notre étude, l'absence de marqueurs d'activation retrouvés sur les cellules T des patients brûlés va à l'encontre de cette hypothèse. La détermination de l'activité des protéases en présence de plusieurs types de cellules immunitaires sera nécessaire pour déterminer l'origine cellulaire et l'implication de l'IL-2Rs dans l'inflammation qui est sous-jacente à une brûlure. Parallèlement à d'autres molécules impliquées dans l'inflammation (PGE<sub>2</sub>, oxyde nitrique), de fortes concentrations d'IL-2Rs peuvent participer à l'immunosuppression. La présence de ce récepteur soluble n'est pas associée directement dans la diminution de l'activité des lymphocytes T mais, sa capacité de se lier à l'IL-2 en compétitionnant avec le récepteur cellulaire d'affinité intermédiaire pourrait expliquer la participation indirecte de cette molécule à l'immunosuppression secondaire à une baisse des concentrations d'IL-2 circulantes. De plus, l'observation d'une dissociation entre la présence de l'IL-2Rs et la production intracellulaire d'IFN $\gamma$  suggère un autre mécanisme de suppression induit par l'IL-2Rs. Ces dernières observations suggèrent l'implication de l'IL-2Rs dans l'équilibre des populations T<sub>H1</sub> et T<sub>H2</sub> en période post-brûlure. Ainsi, au même titre que les PGE<sub>2</sub>, de fortes concentrations d'IL-2Rs pourraient participer à la prédominance des cellules T<sub>H2</sub> retrouvée chez les patients brûlés et participer à la suppression de l'immunité cellulaire qui est grandement



affectée après une brûlure. Cette hypothèse devra toutefois être confirmée avant de pouvoir établir le rôle exact de l'IL-2Rs dans l'inflammation et l'immunosuppression post-brûlure. L'observation d'une diminution des concentrations d'IL-6 et d'IL-2Rs chez les brûlés nourris avec une diète faible en lipides, en parallèle avec l'amélioration de plusieurs paramètres cliniques, suggère qu'une diminution de l'intensité de l'inflammation soit bénéfique pour ces patients. Or, de façon surprenante nous avons montré l'induction d'un état oxydatif et immunosuppresseur profond plus important chez les souris brûlées dont la réponse inflammatoire à la LPS était absente comparativement à des souris dont la réponse inflammatoire à la LPS était normale. Ainsi, d'après les résultats de cette deuxième étude, nous pouvons conclure que l'établissement d'une réponse inflammatoire normale à la LPS semble être utile pour rétablir les fonctions immunitaires post-brûlure. À l'opposé, en contournant la réponse inflammatoire due à la LPS, les souris résistantes à la LPS montrent une élévation significative de l'activation des cellules accessoires qui est reflétée par l'augmentation du stress oxydatif. Cette hyper activation pourrait être responsable de l'anergie profonde et persistante des lymphocytes T retrouvée chez ces animaux. L'utilisation de ce modèle a montré que l'augmentation des niveaux de stress oxydatif, associée à la production de médiateurs inflammatoires et immunosuppresseurs, jouerait un rôle important dans l'induction de l'immunosuppression sous-jacente à une brûlure sévère. Sachant que les lipides de l'alimentation peuvent induire un stress oxydatif, nous avons voulu vérifier les effets d'une quantité variable de lipides dans la diète sur les fonctions du système immunitaire après une brûlure sévère. Plusieurs ont déjà démontré les effets nocifs d'une trop grande quantité de lipides de l'alimentation sur certaines fonctions cellulaires. Ainsi, lors d'une brûlure, les effets nocifs des lipides seraient amplifiés en raison de leur métabolisme anormal et aussi en raison de leur contribution à la production massive de médiateurs inflammatoires et oxydatifs. Dans la troisième étude, nous avons montré une inhibition de la prolifération des splénocytes et une augmentation du stress oxydatif (tel que démontré par les concentrations de MDA hépatique, thiols totaux et production *in vitro* de NO) chez les animaux brûlés ayant reçu une quantité normale (11% des calories totales) ou excessive (45% des calories totales) de lipides dans la diète. L'intensité de la suppression et du stress oxydatif étant

proportionnelle à la quantité de lipides présente dans la diète, ces résultats suggèrent qu'une quantité excessive de lipides alimentaires exacerbent les perturbations causées par la brûlure. À l'opposé, nous avons montré, pour la première fois, un rétablissement complet des fonctions immunitaires des souris brûlées suite à l'administration d'une diète hypo lipidique (2% des calories totale), en période post-brûlure. De plus, l'administration d'une diète faible en lipides a su prévenir le stress oxydatif subséquent à une brûlure en réduisant de façon considérable les taux peroxydation des lipides dans le foie et en diminuant la capacité des cellules stimulées à produire de l'oxyde nitrique. Ainsi, cette étude a permis de confirmer les effets bénéfiques de l'administration d'une diète faible en lipides après une brûlure sévère. Nos résultats suggèrent qu'une diminution de l'intensité de la réponse inflammatoire et oxydative puisse être associée aux effets bénéfiques d'une diète faible en lipides après une brûlure sévère.

## 5. HYPOTHÈSES DES EFFETS BÉNÉFIQUES D'UN FAIBLE APPORT EN LIPIDES APRÈS UNE BRÛLURE

Plusieurs mécanismes peuvent être proposés pour expliquer les effets bénéfiques d'une réduction des apports en lipides après une brûlure :

1) **Une diminution de la réponse inflammatoire.** Cette hypothèse est appuyée par la baisse des concentrations d'IL-6 et d'IL-2Rs chez les patients brûlés ayant reçu une diète faible en lipides, de même que par la diminution de la capacité des cellules à produire des médiateurs inflammatoires (NO et PGE<sub>2</sub>) *in vitro*. Une réduction de l'activité initiale des monocytes/macrophages secondaire à un faible apport en lipides entraînerait une diminution de la production de plusieurs métabolites inflammatoires, oxydatifs et enzymatiques (protéases) qui engendrent des dommages cellulaires sévères. De plus, nous pouvons supposer qu'une réduction de l'apport en lipides alimentaires entraîne une diminution de la production systémique de PGE<sub>2</sub>. En effet par manque de substrats, en l'occurrence l'acide linoléique, les cellules immunitaires pourraient avoir une capacité réduite à produire ce métabolite inflammatoire ayant des propriétés immunosuppressives puissantes. Ainsi comme la brûlure à elle seule produit des quantités importantes de PGE<sub>2</sub>, le fait de diminuer les lipides de la diète, pourrait réduire la capacité de production totale. Ainsi, les effets inflammatoires et immunosuppresseurs de cet éicosanoïde seraient atténués. Par le même phénomène, la production de l'IL-2 et l'équilibre des populations T<sub>H1</sub> et T<sub>H2</sub> seraient rétablis. Ainsi, les effets immunosuppresseurs occasionnés par de grandes quantités de PGE<sub>2</sub> en circulation seraient diminués. Des mesures de l'activité du COX-2 dans les cellules inflammatoires seraient utiles pour vérifier les effets anti-inflammatoires d'un apport réduit en lipides.

2) **Réduction de la peroxydation des lipides.** Comme nous l'avons mentionné précédemment, une brûlure sévère génère une augmentation importante de la lipolyse. Une élévation des acides gras libres plasmatiques découle de ce phénomène. Rappelons également que la majorité des acides gras libres plasmatiques (près de

70%) subit une ré estérification au foie tandis que seulement 30% est utilisé comme substrat. Ainsi, la quantité de lipides exogènes pouvant être utilisée comme source énergétique est limitée chez les brûlés. De plus, la ré estérification hépatique des acides gras est un mécanisme coûteux en énergie pour cet organe qui est déjà très sollicité et impliqué dans la réponse inflammatoire post-brûlure. Des apports élevés en lipides augmentent les risques de peroxydation, favorisant ainsi l'induction du stress oxydatif hépatique. Par opposition, en diminuant la quantité totale de lipides de l'alimentation, la surcharge hépatique en lipides est diminuée et permet ainsi un meilleur métabolisme et une meilleure homéostasie hépatique. La très faible quantité de malonaldehyde hépatique retrouvée chez les animaux nourris avec une faible quantité de lipides suggère une réduction de la peroxydation des lipides chez ces animaux. L'apport minimal en acide gras essentiel et/ou un changement dans la composition en acides gras membranaires pourrait expliquer ce phénomène. Pour confirmer cette hypothèse la détermination du contenu en acides gras des hépatocytes et des macrophages devrait être effectuée dans des études ultérieures afin de déterminer le mécanisme d'action des diètes en lipides sur le stress oxydatif après une brûlure sévère. De plus, il serait intéressant et important de vérifier l'effet de la diète sur les sous-populations de lymphocytes et leurs fonctions associées.

**3) Augmentation de la captation de glucose par les cellules immunitaires.** En diminuant la quantité totale de lipides dans l'alimentation, la disponibilité énergétique de ce substrat est d'autant plus réduite. Sachant que les cellules immunitaires utilisent principalement le glucose comme substrat énergétique, il est possible de penser qu'en diminuant les lipides de la diète, la source d'énergie pour les cellules (le glucose) serait plus facilement assimilable et moins complexe comme mécanisme. On peut également proposer que les fonctions des cellules immunitaires soient plus efficaces en présence d'une grande quantité de glucides et qu'une forte quantité de lipides ralentissent et nuisent aux fonctions de ces cellules.

L'étude des effets modulateurs des lipides de la diète sur les fonctions immunitaires après un traumatisme n'est qu'un exemple des bénéfices obtenus par la modification de

l'apport nutritionnel des patients. Des modifications dans les apports en acides aminés (glutamine, alpha-kétoglutarate), en vitamines antioxydantes ou encore des modifications dans la composition des acides gras de la diète sont aussi des voies de recherches prometteuses pour l'amélioration du traitement des patients brûlés.



Les brûlures étendues constituent un traumatisme grave pour l'organisme. L'induction d'une réponse inflammatoire systémique est généralement suivie d'une suppression globale des fonctions immunitaires. La sévérité de ces réponses métaboliques contribue aux hauts taux de complications infectieuses présent chez les patients brûlés. Sachant que la morbidité infectieuse est une des causes les plus fréquentes de mortalité chez les brûlés, il est donc important d'approfondir nos connaissances afin de mieux comprendre cette pathophysiologie dans le but ultime d'améliorer le statut clinique des ces patients. Les résultats des études présentées dans ce travail ont contribué à éclaircir le rôle de la réponse inflammatoire après une brûlure et son implication dans l'immunosuppression. La modulation post-brûlure de la réponse inflammatoire et oxydative par les lipides de la diète constitue l'originalité de ces travaux. En effet, la démonstration des effets bénéfiques d'une diminution des lipides de l'alimentation chez les patients et chez les animaux brûlés constitue une preuve que les lipides jouent un rôle immunomodulateur important après un traumatisme sévère. D'un point de vue clinique, une amélioration significative a été observée à la suite d'une diminution des lipides de l'alimentation tandis que les études expérimentales ont permis de mieux comprendre les effets protecteurs d'une telle diète. La diminution de l'intensité de la réponse inflammatoire et la réduction du stress oxydatif semblent être associées à ces effets bénéfiques. Des études supplémentaires sont toutefois nécessaires afin de déterminer le mécanisme d'action précis d'un faible apport en lipides sur les fonctions des cellules immunitaires. D'autres études évaluant l'effet des lipides sur les fonctions endocriniennes post-brûlure seraient également justifiées. L'amélioration du traitement des patients brûlés via une modification des apports nutritionnels de la diète constitue une approche innovatrice et non-invasive pour les patients. La poursuite des travaux dans ce domaine constitue une voie de recherche déterminante pour le traitement des patients traumatisés et enrichissante pour l'avancement de la science.

## VIII. BIBLIOGRAPHIE



1. Smith MK, Lowry SF. The hypercatabolic state. In : Modern Nutrition in Health and disease. Chapter 96. 9<sup>TH</sup> Édition. Shils, Olson, Shike, Ross Ed. p.1555-1568, 1999.
2. Muller MJ, Herndon DN. Hormonal interactions in burned patients. Sem in Nephrology 13 (4) : 391-399, 1993.
3. Wolfe RR. Metabolic responses to burn injury : Nutritional implications. In : Total Burn Care. DN Herndon Ed. WB Saunders Company Ltd. 1996. Chapter 20.
4. De Bandt JP, Chollet-Martin S, Hervann A, Lioret N, Du Roure LD, Lim SK, Vaubourrdolle M, Guechot J, Saizy R, Giboudeau J. Cytokine response to burn injury: relationship with protein metabolism. J Trauma 36:624-628, 1994.
5. Tredget EE, Yu YM. The metabolic effects of thermal injury. World J Surg 16:68-79, 1992.
6. Warden GD. Fluid resuscitation and early management. In: Total Burn Care. DN Herndon Ed. WB Saunders Company Ltd. 1996. Chapter 6.
7. Wolfe RR, Herndon DN, Jahoor F, et al. Effect of severe burn injury on substrate cycling by glucose and fatty acids. N Engl J Med 317: 403-408, 1987.
8. Caldwell FT, Bowser GH, Crabtree JH. The effect of occlusive dressings on the energy metabolism of severely burned children. Ann Surg 193: 579-591, 1981.
9. Aulick LH, Wilmore DH, Mason AD Jr, Pruitt BA Jr. Influences of the burn wound on peripheral circulation in thermally injured patients. Am J Physiol 233: H520-H526, 1977.
10. Wilmore DW, Long JM, Mason AD, Pruitt BA Jr. Stress in surgical patients as a neurophysiologic reflex response. Surg. Gynecol. Obstet. 142: 257-269, 1976.
11. Kowal-Versr A, Walenga J, Gamelli R. Trauma and thermal injury: comparison of hemostatic and cytokines changes in the acute phase of injury. J Trauma 44: 325-329, 1998.
12. Yeh F, Lin W, Shen N, Fang R. Changes in TNF-alpha in burned patients. Burns 23: 6-10, 1997.
13. Jeevanandam M, Ramias L, Shamos RF, Shiller WR. Decreased growth hormone levels in the catabolic phase of severe injury. Surgery 111: 495-502 , 1992.

14. Plymate S, Vaughan G, Mason AD, Pruitt BA Jr. Central hypogonadism in burned men. *Horm Res* 27:152-158, 1987.
15. Cunningham JJ, Hegarty MT, Meara PA, Burke JF. Measured and predicted calorie requirements of adults during recovery from severe burn trauma. *Am J Clin Nutr* 49: 404-408, 1989.
16. Ireton CS, Turner WW, Hunt JL, Liepa GU. Evaluation of energy expenditures in burn patients. *J Am Diet Assoc* 86: 331-333, 1986.
17. Uehara M, Plank LD, Hill GL. Components of energy expenditure in patients with severe sepsis and major trauma: a basis for clinical care. *Crit Care Med* 27: 1295-1302, 1999.
18. Allard JP, Pichard C, Hoshino E et al. Validation of a new formula for calculating the energy requirements of burn patient. *JPEN* 14:115-117, 1990.
19. Curreri PW, Richmond D, Marvin J, Baxterr CR. Dietary requirement patients with major burns. *J Am Diet Assoc* 65: 415-417, 1974.
20. Wolfe RR. Caloric requirements of the burned patients. *J trauma* 21: 712-714, 1981.
21. Wilmore DW, Long JM, Mason AD, Skreen RW, Pruitt BA Jr. Catecholamines: mediators of hypermetabolic response to thermal injury. *Ann Surg* 180: 653-669, 1974.
22. Gregory MS, Faunce DE, Duffner LA, Kovacs EJ. Gender difference in cell-mediated immunity after thermal injury is mediated, in part, by elevated levels of interleukin-6. *J Leukoc Biol* 67: 319-326, 2000.
23. Gregory MS, Duffner LA, Faunce DE, Kovacs EJ. Estrogen mediates the sex difference in post-burn immunosuppression. *J Endocrinol* 164: 129-138, 2000.
24. Abribat T, Nedelec B, Jobin N, Garrel DR. Decreased serum insulin-like growth factor-I in burn patients: relationship with serum insulin-like growth factor binding protein-3 proteolysis and the influence of lipid composition in nutritional support. *Crit Care Med* 28: 2366-2372, 2000.
25. Abribat T, Brazeau P, Davignon I, Garrel DR. Insulin-like growth factor-1 blood levels in severely burned patients: Effects of time post-injury, age of patient and severity of burn. *Clin Endocrinol* 39: 583-589, 1993.

26. Ghahary A, Fu S, Shen YJ. Differential effects of thermal injury on circulating insulin-like growth factor binding proteins in burn patients. *Mol Cell Biochem* 135: 171-180, 1994.
27. Selye H. Hormones and hormone-like substances: in *Stress in Health and disease*. Boston, Butterworths, pp 454-464, 1976.
28. Woloske BMRNJ, Smith EM, Meyer WJ III, Fuller GM, Blalock JE. Corticotropin-releasing activity of monokines. *Science* 230: 1035-1037, 1985.
29. Garrel DR, Razi M, Larivière F, Jobin N, Naman N, Emptoz-Bonneton A, Pugeat MM. Improved clinical status and length of care with low fat nutrition support in burn patients. *JPEN* 19:482-491, 1995.
30. Rosner W. Plasma steroid-binding proteins. *Endocrinol Metab Clin North Am* 20: 697-721, 1991.
31. Pemberton PA, Stein PE, Pepys MB, Potter JM, Carrell RW. Hormone-binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation. *Nature* 336: 257-258, 1988.
32. Siiteri PK, Murai JT, Hammond GL, Nisker JA, Raymoure WJ, Kuhn RW. The serum transport of steroid hormones. *Recent Prog Horm Res.* 38: 457-510, 1982.
33. Pugeat D, Bonneton A, Perrot D, Rock-Nicolas B, Lejeune H, Grenot C, Deschaud H, Brebapt C, Motin J, Cuilleron CY. Decreased immunoreactivity and binding activity of corticosteroid-binding globulin in serum in septic shock. *Clin Chem* 35: 1675-1679, 1989.
34. Faict D, Vandoren G, De Moor P, Lesaffre E, Verhoeven G. Response of transcortin and alpha 2 globulin to turpentine-induced inflammation in the rat: influence of corticosteroids and prolactin. *J Endocrinol* 99: 465-468, 1983.
35. Garrel DR, Gaudreau P, Zhang L, Reeves I, Brazeau P. Effect of burn injury on corticosteroid-binding globulin levels in plasma and wound fluid. *Wound Rep Reg* 1: 10-14, 1993.
36. Bartalena L, Hammond GL, Farsettin A, Flink IL, Robbins J. Interleukin-6 inhibits corticosteroid-binding globulin synthesis by human hepatoblastoma-derived (Hep G2) cells. *Endocrinology* 133: 291-296, 1993.

37. Bernier J, Jobin N, Emptoz-Bonneton A, Pugeat MM, Garrel DR. Decreased corticosteroid-binding globulin in burn patients: Relationship with interleukin-6 and fat in nutritional support. *Crit Care Med* 26: 452-460, 1998.
38. Wolfe R. Relation of metabolic studies to clinical nutrition: the example of burn injury. *Am J Clin Nutr* 64: 800-808, 1996.
39. Jahoor F, Herndon DN, Wolfe RR. Role of insulin and glucagon in the response of glucose and alanine kinetics in burn-injured patients. *J Clin Invest* 78: 807-814, 1986.
40. Waymack JP, Herndon DN. Nutritional support of the burned patient. *World J Surg* 16: 80-86, 1992.
41. Wilmore DW, Aulick LH, Mason AD Jr, Pruitt BA Jr. Influence of burn wound on local and systemic response to injury. *Ann Surg* 186:444-458, 1977.
42. Wolfe RR, Herndon DN, Peters EJ, Jahoor F, Desai MH, Holland OB. Regulation of lipolysis in severely burned children. *Ann Surg* 206: 214-221, 1987.
43. Harris RI, Frenkel RA, Cottam GL, Baxter CR. Lipid mobilization and metabolism after thermal injury. *J Trauma* 22: 194-198, 1982.
44. Abbott WC, Schiller WR, Long CL, Birkhahn RH, Blakemore WS. The effect of major thermal injury on plasma ketone body levels. *J Parenter Enteral Nutr* 9: 153-158, 1985.
45. Kinsella JE, Lokesh B. Dietary lipids, eicosanoids, and the immune system. *Crit Care Med* 18:94-113, 1990.
46. Kinney JM, Elwyn DH. Protein metabolism and injury. *Ann Rev Nutr* 3:433-466, 1983.
47. Wolfe R, Goodenough R, Barke J. Response of protein and urea kinetics in burn patients to different levels of protein intake. *Ann Surg* 197:163-171, 1983.
48. Demling RH, Seigne P. Metabolic management of patients with severe burns. *World J Surg* 24:673-680, 2000.
49. Jahoor F, Desai M, Herndon DN, Wolfe RR. Dynamics of the protein metabolic response to burn injury. *Metabolism* 37:330-337, 1988.
50. Pollack SV. Wound healing; a review III. Nutritional factors affecting wound healing. *J Dermatol Surg Oncol* 5:615-619, 1979.

51. Aulick LH, Wilmore DW. Increased peripheral amino acid release following burn injury. *Surgery* 85:560-565, 1979.
52. Grecos GP, Abbott WC, Schiller WR, Long CL, Birkhan RH, Blackemore WS. The effect of major thermal injury and carbohydrate-free intake on serum triglycerides, insulin, and 3-methylhistidine excretion. *Ann Surg* 200:632-637, 1984.
53. Jepson MM, Pell JM, Bates PC, Millward DJ. The effects of endotoxaemia on protein metabolism in skeletal muscle and liver of fed and fasted rats. *Biochem J* 235:329-336, 1986.
54. May RC, Kelly RA, Mitch WE. Metabolic acidosis stimulates protein degradation in rat muscle by a glucocorticoid dependent mechanism. *J Clin Invest* 77: 614-621, 1986.
55. Medina R, Wing SS, Haas A, Goldberg AL. Activation of the ubiquitin-ATP-dependent proteolysis system in skeletal muscle during fasting and denervation atrophy. *Biomed Biochim Acta* 50:347-356, 1991.
56. Clark AS, Kelly RA, Mitch WE. Systemic response to thermal injury in rats. *J Clin Invest* 74:888-897, 1984.
57. Rennie MJ, MacLennan PA, Hundal HS, Weryk B, Smith K, Taylor PM, Egan C, Watt PW. Skeletal muscle glutamine transport, intramuscular glutamine concentration and muscle protein turnover. *Metabolism* 38: 47-51, 1989.
58. Welbourne TC, Joshi S. Interorgan glutamine metabolism during acidosis. *JPEN* 14: 77S-85S, 1990.
59. Cynober L, Marcollet M. Métabolisme des protéines. *Encyclo Méd Chir* 10-375-A 10-12, 1994.
60. Barbul A. Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications. *JPEN* 10: 227-238, 1986.
61. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142, 1991.
62. Rodrigues D. Nutrition in patients with severe burns: state of the art. *J Burn Care Rehabil* 17:62-66, 1996.
63. Lacey JM, Wilmore DW. Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutr Rev* 48: 297-309, 1990.

64. Wernerman J, Hammarkvist F, Ali MR, Vinsars E. Glutamine and ornithine-alpha-ketoglutarate but not branches chain amino acids reduce the loss of muscle glutamine after surgical trauma. *Metabolism* 38:63-66, 1989.
65. Goodwin C W. Metabolism and nutrition in the thermally injured patient. *Crit Care Clin* 1: 97-117, 1985.
66. Arturson G. Pathophysiology of the burn wound and pharmacological treatment. The Rudi Hermans Lecture, 1995. *Burn*, 22 : 255-274, 1996.
67. Darville T, Giroir B, Jacobs R. The systemic inflammatory response syndrome (SIRS) : immunology and potential immunotherapy. Review. *Infection* 21: 279-290; 1993.
68. Maurice E. Shils, James A. Olson, Moshe Shike, A. Catharine Ross. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Ninth edition. Williams & Wilkins. 1999.
69. Marieb, E N. *Anatomie et physiologie humaine*. 2<sup>e</sup> édition. Editions du Renouveau Pédagogique Inc. 1999.
70. Hinder F, Traber, D L. Pathophysiology of the systemic inflammatory response syndrome. In : *Total Burn Care*. DN Herndon Ed. WB Saunders Company Ltd. 1996.
71. Brenner BM, Troy JL, Balterman BJ. Endothelium-dependent vascular response: mediators and mechanism. *J Clin Invest* 84: 1373-1378, 1989.
72. Bradley JR, Wilks D, Rubenstein D. The vascular endothelium in septic shock. *J Infection* 28: 1-5, 1994.
73. Bernard C, Tedgui A. Cytokine network and the vessel wall: insight into septic shock pathogenesis. *Eur Cytokin New* 3:19-22, 1992.
74. Stern DM, Esposito C, Gerlach H et al. Endothelium and regulation of coagulation. *Diabetes Care* 14: 160-166, 1991.
75. Shilling J A. Wound healing. *Physiol. Rev.* 48: 374-423, 1968.
76. Moissec P, Ziff M. Immune interferon enhance the production of interleukin 1 by human endothelial cells stimulated by lipopolysaccharide. *J immunol* 37: 2849-2852, 1986.
77. Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF/cachectin. *Nature* 346: 274-276, 1990.

78. Le J, Weinstein D, Galle D, Vilcek J. Induction of membrane associated interleukin1 by tumor necrosis factor in human fibroblasts. *J Immunol* 138: 2137-2142, 1987.
79. Abbas A K et al. Cellular and molecular immunology. Second Edition. WB Saunders Company. USA, 1991.
80. Van Deuren M, Dofferhoff A S M, Van Der Meer J W M. Cytokines and the response to infection. Review article. *J Pathol* 168 : 349-356, 1992.
81. Tracey K J, Cerami A. Tumor necrosis factor: an update review of its biology. *Crit Care Med* 21:415-422, 1993.
82. Liu X S, Yang Z C, Luo Z H, Huang WH, Li A. A preliminary exploration of the relationship between tumour necrosis factor (TNF) and monocytic in vitro production of interleukin-1 (IL-1) and internal organ dysfunction in severely burned patients. *Burns* 21:29-33, 1995.
83. Lowry S F. Cytokine mediators of immunity and inflammation. *Arch Surg* 128:1235-1241, 1993.
84. Klebanoff S J, Vadas M A, Harlan J M, Sparks LH, Gamble JR, Agosti JM, Walterdorff AM. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J Immunol* 136:4220-4225, 1986.
85. Endo S, Inada K, Yamada Y, Kasai T, Takakawa T, Nakac H, Kikuchi M, Hushi S, Suzuk M, Yamashita H. Plasma tumor necrosis factor- $\alpha$  levels in patients with burns. *Burns* 19:124-127, 1993.
86. Marano M A, Fong Y, Moldawer L L, Wei H, Calvano SE, Tracey KJ, Barie PS, Manogne L, Cerami A, Shires GT et al. Serum cachetin/tumor necrosis factor in critically ill patients with burns correlates with infection mortality. *Sur Gynecol Obstet*, 170:32-38, 1990.
87. Cinat M, Waxman K, Vaziri ND, Daughters K, Yousefi S, Scannell G, Tominaga GT. Soluble cytokine receptors and receptor antagonists are sequentially released after trauma. *J Trauma* 39: 112-120, 1995.
88. Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv immunol* 54:167-227, 1993.
89. Arend WP, Welgus HG, Thompson RC, et al. Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin-1 receptor antagonist. *J Clin Invest* 85:1694-1697, 1990.

90. Vannier E, Miller LC, Dinarello CA. Coordinated anti-inflammatory effects of interleukin-4: interleukin-4 suppress interleukin-1 production but up-regulated gene expression and synthesis of interleukin receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci* 89: 4076-4080, 1992.
91. Vindenes H. *Host Defense and Inflammation in Patients with Large Burns*. Bergens; Doves Trykkeri AS, 1994.
92. Ohlsson K, Bjork P, Bergenfeld T, Hageman R, Thompson RC. Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. *Nature* 348: 550-552, 1990.
93. Aiura K, Gelfand JA, Burke JF, Thompson RC, Dinarello CA. Interleukin-1 receptor antagonist prevents S. epidermidis-induced hypotension and reduces circulating levels of TNF and IL-1 $\beta$  in rabbits. *Infect Immun* 61: 3342-3350, 1993.
- 93b. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv. Immunol.* 54: 1-78, 1993.
94. Zhou D, Kusnecov A, Shurin M, De Paoli M, Rabin BS. Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma levels of IL-6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology*, 133 : 2523-2530, 1993.
95. Nijsten M W, Hack C E, 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*, 109 : 761-767, 1991.
96. Struzyna J, Pojda Z, Braun B, Chomicka M, Sobiczewska E, Wrembel J. Serum cytokine levels (IL-4, IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF) in burn patients. *Burn* 21: 437-440, 1995.
97. Zhou DH, Munster AM, Winchurch RA. Inhibitory effects of interleukin-6 on immunity. *Arch Surg* 127:65-68, 1992.
98. Zhou D, Munster A, Winchurch R A. Pathologic concentration of interleukin 6 inhibit T cell responses via induction of activation of TGF- $\beta$ . *FASEB J* 5:2582-2585, 1991.
99. Afford SC, Pongracz J, Stockley RA, Crocker J, Burnett D. The induction by human interleukin-6 of apoptosis in the promonocytic cell line U937 and human neutrophils. *J Biol Chem* 267: 21612-21616, 1992.



100. Ninnemann JL, Stockland AE. Participation of prostaglandin E in immunosuppression following thermal injury. *J Trauma* 24: 201-207, 1984.
101. Yang L, Hau B. The role of macrophage (M $\phi$ ) and PGE-2 in postburn immunosuppression. *Burns* 18: 132-136, 1992.
102. Szabo G, Kodys K, Miller-Graziano CI. Elevated elevated Il-6 production by immunosuppressed trauma patients. Role of Fc gamma RI cross-linking stimulation. *J Clin Immunol* 11: 326-335, 1991.
103. Gennari R, Alexander J W, Eaves-Pyles. INF- $\gamma$  decreases translocation and improves following transfusion and thermal injury. *J Surg Res* 56:530-536, 1994.
104. Durbin EA, Gregory MS, Messingham KA, Fontanilla CV, Duffner LA, Kovacs EJ. The role of interleukin 6 in interferon-gamma production in thermally injured mice. *Cytokine* 12: 1669-1675, 2000.
105. Sheridan R L, Tompkins R G. Etiology and prevention of multisystem organ failure. In : Total Burn Care. DN Herndon Ed. WB Saunders Company Ltd. 1996.
106. Ramwell P W, Leovey E M, Sintetos A L. Regulation of arachidonic acid cascade. *Biol reprod* 16:70-87, 1977.
107. Weber P C, Sellmayer A. Modification of the eicosanoid system and cell signaling by precursor fatty acids. *Advances in prostaglandin, thromboxane, and leukotriene research.* 21:217-223, 1990.
108. Arturson G. Possible involvement of arachidonic acid metabolites in thermal trauma. In: Dolecek R, Brizio-Molteni L, Traber D, eds. *Endocrinology of thermal trauma: pathophysiological mechanisms and clinical interpretation.* Philadelphia: Lea & Febiger, p 238, 1990.
109. Harms B, Bodai B, Demling R. Prostaglandin release and altered microvascular integrity after burn injury. *J Surg Res* 31:274-280, 1981.
110. Anggard E, Jonsson CE. Efflux of prostaglandins in lymph from scalded tissue. *Acta Physiol Scand.* 81: 4400-443, 1971.
111. Alexander WJ. Mechanism of immunologic suppression in burn injury. *J Trauma* 30: S70-S74, 1990.

112. Lewis R A, Austen K F. The biologically active leukotrienes. Biosynthesis, metabolism, receptors, functions, and pharmacology. *J Clin Invest* 73:889-897, 1984.
113. Davis J M, Meyer J D, Barie P S, Yurt RW, Duhaney R, Dineen P, Shires GT. Elevated production of neutrophil leukotriene B<sub>4</sub> precedes pulmonary failure in critically ill surgical patients. *Surg Gynecol Obstet* 170:495-500, 1990.
114. Palmer R M, Ferrige A G, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987.
115. Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. In: H, ed. *Oxidative stress*. Orlando, FL: Academic Press, 1985, 1-10.
116. Flavier A. Radicaux libres, peroxydation et stress oxydant. In : *Traité de Nutrition Artificielle de l'adulte*. Mariette Guéna ed. Paris, 1998, 229-240.
117. Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 15:129-135, 1990.
118. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol reviews* 59:527-604, 1979.
119. Winterbourn C. Neutrophils oxydants productions and reactions. In: Das Dn Essman W, eds. *Oxygen radicals: systemic events and disease process*. Basel, Karger, 31-70, 1990.
120. Haglund U, Gerdin B. Trends in shock research. Oxygen free radicals (OFR) and circulatory shock. *Circ Shock* 34:405-411, 1991.
121. Kaufman T, Neuman RA, Weinberg A. Is postburn dermal ischaemia enhanced by oxygen free radicals? *Burns* 15:291-294, 1989.
122. Demling RH, Lalonde C. Systemic lipid peroxidation and inflammation induced by thermal injury persists into the post resuscitation period. *J Trauma* 30:69-74, 1990.
123. Hiramatsu M, Izawa Y, Hagihara M, Nishigaki I, Yagi K. Serum lipid peroxide levels of patients suffering from thermal injury. *Burns Incl Therm Ing* 11:111-116, 1984.
124. Thomson PD, Till GO, Woolliscroft JO, Smith DJ, Prasad JK. Superoxide dismutase prevents lipid peroxidation in burned patients. *Burns* 16: 406-408, 1990.

125. Kumar R, Seth RK, Sekhon MS, Bhargava JS. Serum lipid peroxide and other enzyme levels of patients suffering from thermal injury. *Burns* 21:96-97, 1995.
126. Saez JC, Ward PH, Gunther B, Vivaldi E. Superoxide radical involvement in the pathogenesis of burn shock. *Circ Shock* 12:229-239, 1984.
127. Till GO, Hatherill JR, Tourtellotte WW, Lutz MJ, Ward PA. Lipid peroxidation and acute lung injury after thermal trauma to skin. Evidence of a role for hydroxyl radical. *Am J Pathol* 119: 376-384, 1985.
128. Till GO, Guilds LS, Mahrougui M, Friedl HP, Trentz O, Ward PA. Role of xanthine oxidase in thermal injury of skin. *Am J Pathol* 135:195-202, 1989.
129. Friedl HP, Till GO, Ryan VS, Ward PA. Mediator-induced activation of xanthine oxidase in endothelial cells. *FASEB J* 3: 2512-2518, 1989.
130. Hosford D, Braquet P. The potential role of platelet activating factor in shock and ischemia. *J Crit Care* 5: 115-136, 1990.
131. Sun X, Wei H. Bowel necrosis induced by tumor necrosis factor in rats is mediated by platelet-activating factor. *J Clin Invest* 81:1328-1331, 1988.
132. Ono I, Gunji H, Hasegawa T, Harada H, Kaneko F, Matsuzaki M. Effects of a platelet activating factor antagonist on edema formation following burns. *Burns* 3:202-207, 1993.
133. Munster AM. Alterations of the host defense mechanism in burns. *Surg Clin North Am* 50 :1217-1225, 1970.
134. Rapaport FT, Miligram F, Kano K, Gesner B, Solowey AC, Casson P, Silverman HI, Converse JM. Immunologic sequelae of thermal injury. *Ann NY Acad Sci* 150:1004-1008, 1968.
135. Munster AM, Eurenus K, Katz RM, Canales L, Foley FD, Mortensen RF. Cell-mediated immunity after thermal injury. *Ann Surg* 117: 139 -143, 1973.
136. Wolfe JHN, Wu AVO, O'Connor NE, Saporoschetz J, Mannick JA. Anergy, immunosuppressive serum, and impaired lymphocyte blastogenesis in burn patients. *Arch Surg* 117: 1266-1271, 1982.
137. Bjerknes R, Vindenes H, Learun OD. Altered neutrophil functions in patients with large burns. *Blood-Cells* 16: 127-135, 1990.

138. Deitch EA, Landry KN. Neutrophil subpopulations change after thermal injury. *J. Trauma* 26: 534-537, 1986.
139. Zapata-Sirvent RL, Hansbrough JF. Temporal analysis of human leucocyte surface antigen expression and neutrophil respiratory burst activity after thermal injury. *Burns* 19: 5-11, 1993.
140. Mainous MR, Deitch EA. Nutrition and infection. *Surg Clin North Am* 74 : 659-696, 1994.
141. Hammer JH, Nielsen HJ, Moesgaard F, Kehlet H. Duration of postoperative immunosuppression assessed by repeated delayed type hypersensitivity skin tests. *Eur Surg Res* 24:133-137, 1992.
142. Schmand JF, Ayala A, Cahudry IH. Effects of trauma, duration of hypotension, and resuscitation regimen on cellular immunity after hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 22: 1076-1083, 1994.
143. Toedorczyk-Injeyan JA, Sparkes BG, Mills GB, Peters WJ. Immunosuppression follows systemic T lymphocyte activation in the burn patient. *Clin Exp Immunol* 85: 515-518, 1991.
144. Kell MR, Kavanaugh EG, Goebel A, Soberg CC, Lederer JA. Injury primes the immune system for an enhanced and lethal T-cell response against bacterial superantigen. *Shock* 12: 139-144, 1999.
145. Jobin N, Garrel DR, Nernier J. Increased serum-soluble interleukin-2 receptor in burn patients: characterization and effects on the immune system. *Hum Immunol* 61: 233-246, 2000.
146. Kelly JL, Lyons A, Soberg CC, Mannick JA, Lederer JA. Anti-IL-10 antibody restores burn induced defects in T cell function. *Surgery* 122: 146-152, 1997.
147. Rioja LF, Alonso P, De Haro J, de la Cruz J. Pronostic value of the CD4/CD8 lymphocytes ratio in moderately burned patients. *Burns* 19:198-201, 1993.
148. O'Mahony JB, Wood J, Rodrick ml, Mannick JA. Changes in T lymphocyte subsets following injury: assessment by flow cytometry and relationship to sepsis. *Ann Surg* 202: 580-586, 1985.

149. Burleson DG, Mason AD, Pruitt BA. Lymphoid subpopulation changes after thermal injury and thermal injury with infection in an experimental model. *Ann Surg* 207: 208-212, 1988.
150. Organ BC, Antonacci AC, Chiao J, Kumar A, DeRiesthel HF, Yvan L, Black D, Calvano SE. Changes in lymphocyte number and phenotype in seven lymphoid compartments after thermal injury. *Ann Surg* 210: 78-89, 1988.
151. Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock* 11 : 153-159, 1999.
152. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76:241-251, 1994.
153. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 and more. *Immunol Today* 17 : 138-146, 1996.
154. Cherwinski HM, Schumacher JH, Brown KD, Mosmann TR. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Exp Med* 166 :1229-1244, 1987.
155. Stevens TL, Bossie A, Sanders VM, Fernandez-Botran R, Coffman RL, Mosmann TR, Vitetta ES. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 334:255-258, 1988.
156. Sher A, Fiorentino DF, Caspar P, Pearce E, Mosmann T. Production of IL-10 by CD4<sup>+</sup> lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. *J Immunol* 147: 2713-2716, 1991.
157. Noble A, Staynov DZ, Kemeny DM. Generation of rat Th2-like cells in vitro is interleukin-4-dependant and inhibited by interferon- $\gamma$ . *Immunology* 79: 562-567, 1993.
158. Swain SL, McKenzie DT, Weinberg AD, Hancock W. Characterization of T helper 1 and 2 cell subsets in normal mice: helper T cells responsible for IL-4 and IL-5 production are present as precursor that require priming before they develop into lymphokine-secreting cells. *J Immunol* 141: 3445-3455, 1988.
159. O'Sullivan ST, Lederer JA, Horgan AF, Chin DHL, Mannick JA, Rodrick ML. Major injury leads to predominance of the T Helper-2 lymphocyte phenotype and

- diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Ann Surg* 222 : 482-492, 1995.
160. Zedler S, Bone RC, Baue AE, Donnersmark GH, Faist E. T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns. *Crit Care Med* 27 : 66-72, 1999.
  161. DiPiro JT, Howdieshell TR, Goddard JK, Callaway DB, Hamilton RG, Mansberger AR Jr. Association of interleukin-4 plasma levels with traumatic injury and clinical course. *Arch Surg* 130: 1159-1163, 1995.
  162. Sherry RM, Cue J, Goddard JK, et al. Interleukin-10 is associated with the development of sepsis in trauma patients. *J Trauma* 40:613-616, 1996.
  163. Kelly JL, O'Suilleabhain CB, Soberg CC, Mannick JA, Lederer JA. Severe injury triggers antigen-specific T-helper cell dysfunction. *Shock* 12 : 39-45, 1999.
  164. Lyons A, Kelly JL, Rodrick ml, Mannick JA, Lederer JA. Major injury induces increased production of interleukin-10 by cells of the immune system with a negative impact on resistance to infection. *Ann Surg* 226 : 450-460, 1997.
  165. Kobayashi M, Herndon DN, Pollard RB, Suzuki F. CD4+ contrasuppressor T cells improve the resistance of thermally injured mice infected with HSV. *J Leuk Biol* 58: 159-167, 1995.
  166. Mack VE, McCarter MC, Naama HA, Calvano SE, Daly JM. Dominance of T-helper 2-type cytokines after severe injury. *Arch Surg* 131:1303-1308, 1996.
  167. Lyons A, Goebel A, Mannick JA, Lederer JA. Protective effects of early interleukin 10 antagonism on injury-induced immune dysfunction. *Arch Surg* 134:1317-1324, 1999.
  168. Miller-Graziano CL, De AK, Kodys K. Altered IL-10 levels in trauma patients' MO, T lymphocytes. *J Clin Immunol* 15:93-104, 1995.
  169. Kavanagh EK, Kell MR, Goebel A, Soberg CC, Mannick JA, Lederer JA. Interleukin 10 is not essential for survival or for modulating T-cell function after injury. *Surgery* 126: 456-462, 1999.
  170. Goebel A, Kavanagh E, Lyons A, Saporoschetz IB, Soberg C, Lederer JA, Mannick JA, Rodrick ML. Injury induces deficient interleukin-12 production, but interleukin-12 therapy after injury restores resistance to infection. *Ann Surg* 231: 253-261, 2000.

171. Ramirez F, Fowell DJ, Puklavec M, Simmonds S, Mason D. Glucocorticoids promote a T<sub>H</sub>2 cytokine response by CD4<sup>+</sup> T cells in vitro. *J Immunol* 156 :2406-2412, 1996.
172. Sanders VM, Baker RA, Ramer-Quinn DS, Kasprovicz DJ, Fuchs BA, Street NE. Differential expression of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor by T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 clones : implications for cytokine production and B cell help. *J Immunol* 158 :4200-4210, 1997.
173. Faist E, Kupper TS, Baker CC, Chaudry IH, Dwyer J, Baue AE. Depression of cellular immunity after major injury: its association with posttraumatic complications and its reversal immunomodulation. *Arch Surg* 121: 1000-1005, 1986.
174. Katamura K, Shintaku N, Yamauchi Y, Fukui T, Ohshima Y, Mayumi M, Furusho K. Prostaglandin E2 at priming of naive CD4<sup>+</sup> T cells inhibits acquisition of ability to produce IFN $\gamma$ , IL-2, but not IL-4 and IL-5. *J Immunol* 155:4604-4612, 1995.
175. Schwacha MG, Somers SD. Thermal injury-induced immunosuppression in mice: the role macrophage-derived reactive nitrogen intermediates. *J Leuk Biol* 63: 51-58, 1998.
176. Horgan AF, O'Riordain DS, Chin DHL, Mannick JA, Rodrick M.L. The role of cyclic adenosine monophosphate in the suppression of cellular immunity after thermal injury. *Arch Surg* 129:1284-1289, 1994.
177. Wood JJ, Grbic JT, Rodrick ML, Jordan A, Mannick JA. Suppression of interleukin 2 production in an animal model of thermal injury is related to prostaglandin synthesis. *Arch Surg* 122: 179-184, 1987.
178. Grbic JT, Mannick JA, Gough DB, Rodrick ML. The role of prostaglandin E2 in immune suppression following thermal injury. *Ann Surg* 214: 253-263, 1991.
179. Liu XS, Luo ZH, Yang ZC, Li AN. Clinical significance of the alterations of plasma prostaglandin E2 in severe burned patients. *Burns* 22: 298-302, 1996.
180. Ogle CK, Mao JX, WU JZ, Ogle JD, Alexander JW. The production of tumor necrosis factor, interleukin-1, interleukin-6, and prostaglandin E2 by isolated

- enterocytes and gut macrophages: effect of lipopolysaccharide and thermal injury. *J Burn Care Rehabil* 15: 470-477, 1994.
181. Schwacha MG, Ayala A, Cioffi WC, Bland KI, Chaudry IH. Role of protein kinase C in cyclic AMP-mediated suppression of T-lymphocyte activation following burn injury. *Biochimica et Biophysica Acta* 1455: 45-53, 1999.
182. Rincon M, Tugores A, Lopez-Rivas A, Silva A, Alonso M, De Landazuri MO, Lopez-Botet M. Prostaglandins E2 and the increase of intracellular cAMP inhibit the expression of interleukin 2 receptors in human T cells. *Eur J Immunol* 18:1791-1796, 1988.
183. Krause DS, Deutsch C. Cyclic AMP directly inhibits IL-2 receptor expression in human T cells: expression of both p55 and p75 subunits is affected. *J Immunol* 146:2285-2296, 1991.
184. Anastassiou ED, Paliogianni F, Balow JP, Yamada H, Boumpas DT. Prostaglandin E2 and other cyclic AMP-elevating agents modulate IL-2 and IL-2R $\alpha$  gene expression at multiple levels. *J Immunol* 148: 2845-2852, 1992.
185. Johnson KW, Smith KA. CAMP regulation of IL-2 receptor expression. Selective modulation of the p75 subunit. *J Immunol* 145: 1144-1151, 1990.
186. Benbernou N, Esnault S, Shin HC, Fekkar H, Guenounou M. Differential regulation of IFN-gamma, IL-10 and inducible nitric oxide synthetase in human T cells by cyclic AMP-dependent signal transduction pathway. *Immunology* 91:361-368, 1997.
187. Teodorczyk-Injeyan JA, Sparkes BG, Mills GB, Falk RE, Peters WJ. Impairment of T cell activation in burn patients: a possible mechanism of thermal injury-induced immunosuppression. *Clin Exp Immunol.* 65: 570-586, 1986.
188. Wood JJ, Rodrick ML, O'Mahoney JB, Palder SB, Saporoschetz I, D'Eon P, Mannick JA. Inadequate interleukin-2 production: a fundamental immunological deficiency in patients with major burns. *Ann Surg* 200:311-320, 1984.
189. Moss NM, Gough DB, Jordan A, Grbic JT, Wood JJ, Rodrick ML, Mannick JA. Temporal correlation of impaired immune response after thermal injury with susceptibility to infection in a murine model. *Surgery* 104: 882-887, 1988.



190. Nelson BH, Willerford DM. Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol* 70 : 1-81, 1998.
191. 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 *Ann Surg* 220: 342-351, 1994.
192. Santoli D, Phillips PD, Colt TC, Zurier RB. Suppression of interleukin 2-dependant human T cell growth in vitro by prostaglandin E (PGE) and their precursors fatty acids. *J Clin Invest* 85: 424-432, 1990.
193. Faist E, Mewes A, Baker CC, Strasser TH, Alkan SS, Rieber P, Herberer G. Prostaglandin E2 (PGE2)-dependant suppression of interleukin 2 (IL-2) production in patient with major trauma. *J Trauma*. 27: 837-848, 1987.
194. Zurier RB. Fatty acids, inflammation and immune responses. *Prostaglandins leukotrienes and essentials fatty acids*. 48: 57-62, 1993.
195. O'Riordain DS, Mendez MV, Holzheimer RG, Collins K, Mannick JA, Rodrick ml. Interleukin-2 receptor expression and function following thermal injury. *Arch Surg* 130: 165-170, 1995.
196. Teodorczyk-Injeyan JA, Sparkes BG, Mills BG, Falk RE, Peters WJ. Increase of serum interleukin-2 receptor level in thermally injured patients. *Clin Immunol Immunopathol* 51: 205-215, 1989.
197. Teodorczyk-Injeyan JA, Sparkes BG, Mills BG, Peters WJ. Soluble interleukin 2-receptor  $\alpha$  is related to altered interleukin 2 production in thermally injured patients. *Burns* 17: 290-295, 1991.
198. Schinkel C, Zimmer S, Durda PJ, Höcherl E, Herndon DN, Faist E. Kinetics of soluble interleukin-2 receptor after mechanical and burn trauma. *J Burn Care Rehab* 18: 210-213, 1997.
199. Delogu G, Casula A, Mancini P, Tellañ G, Signore L. Serum neopterin and soluble interleukin-2 receptor for prediction of a shock state in gram-negative sepsis. *J Crit Care* 10: 64-71, 1995.
200. Tobata T, Meyer AA. Effects of burn injury on class-specific B-cell population and immunoglobulin synthesis in mice. *J Trauma* 35: 755-759, 1993.

201. Schleiter B, Konig W, Koller M, Erbs G, Muller FE. Differential regulation of T and B lymphocyte activation in severely burned patients. *J Trauma* 31: 239-249, 1991.
202. Schleiter B, Konig W, Koller M, Erbs G, Muller FE. Studies in B lymphocytes dysfunctions in severely burned patients. *J Trauma* 30: 1380-1389, 1990.
203. Kagan RJ, Bratescu A, Jonasson O, Matsuda T, Teodorescu M. The relationship between the percentage of circulating B cells, corticosteroid level and other immunologic parameters in thermally injured patients. *J Trauma* 29: 208-213, 1989.
204. Kawatami M, De Serres S, Meyer AA. Immunoglobulin synthesis by cultured lymphocytes from spleen and mesenteric lymph nodes after thermal injury. *J Burn Care Rehabil* 12: 474-481, 1991.
205. Antonacci AC, Reaves IE, Calvano JE, Arnand R, De Riesthel HF, Shires GT. Flow cytometric analyses of lymphocyte subpopulation after thermal injury in human beings. *Surg Gynecol Obstet* 159: 1-8, 1984.
206. Teodorczyk-Injeyan JA, Sparkes BG, Peters WJ. Regulation of IgM production in thermally injured patients. *Burns* 15: 241-247, 1989.
207. Mills CD. Molecular basis of suppressor macrophages. Arginine metabolism via the nitric oxide synthetase pathway. *J Immunol* 146: 2719-2723, 1991.
208. Unanue ER, Allen PM. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 236: 551-557, 1987.
209. Sternberg J, McGuigan F. Nitric oxide mediates suppression of T cell responses in murine *Trypanosoma brucei* infection. *Eur J Immunol* 22: 2741-2744, 1992.
210. Kawabe T, Isobe KL, Hasegawa Y, Nakashima I, Shimokata K. Immunosuppressive activity induced by nitric oxide in culture supernatant of activated rat alveolar macrophages. *Immunol* 76: 72-78, 1992.
211. Metzger Z, Hoffeld JT, Oppenheim JJ. Macrophage mediated suppression. I. Evidence for participation of both hydrogen peroxide and prostaglandins in suppression of murine lymphocyte proliferation. *J Immunol*. 124: 983-988, 1980.
212. Allison AC. Mechanisms by which activated macrophages inhibit lymphocyte responses. *Immunol. Rev.* 40: 1-23, 1978.

213. Cooper KD, Oberhelman L, Hamilton TA, et al. Neopterin as parameter of cell-mediated immunity response in thermally injured patients. *Burns* 18 : 113-116, 1992.
214. Balogh D, Lammer H, Kornberger E, Stuffer M, Schonitzer D. Neopterin plasma levels in burn patients. *Burns* 18 : 185-188, 1992.
215. Minei JP, Williams JC, Hills SD, McIntyre K, Bankey PE. Augmented tumor necrosis factor response to lipopolysaccharide after thermal injury is regulated postranscriptionally. *Arch Surg* 129: 1198-1203, 1994.
216. Antonacci AC, Calvano SE, Reaves LE, Prajapati A, Bockman R, Welte K, Mertelsmann R, Gupta S, Good RA, Shires GT. Autologous and allogenic mixed-lymphocyte responses following thermal injury in man: the immunomodulatory effects of interleukin 1, interleukin 2, and a prostaglandin inhibitor, WY-18251. *Clin Immunol Immunopathol* 30:304-320, 1984.
217. Gadd MA, Hansbrough JF. Postburn suppression of murine lymphocyte and neutrophil functions is not reversed by prostaglandin blockade. *Surg Res* 48: 84-90, 1990.
218. Al-Ramadi BK, Meissler JJ Jr, Huang D, Eisenstein TK. Immunosuppression induced by nitric oxide and its inhibition by interleukin-4. *Eur J Immunol* 22: 2249-2254, 1992.
219. Stein CS, Strejan GH. Rat splenocytes inhibits antigen-specific lymphocyte proliferation through a reactive nitrogen intermediate (RNI)-dependent mechanism and exhibit increased RNI production in response to IFN- $\gamma$ . *Cell Immunol* 150:281-297, 1993.
220. Mills CD. Molecular basis of suppressor macrophages. Arginine metabolism via the nitric oxide synthetase pathway. *J Immunol* 146: 2719-2723, 1991.
221. Albina JE, Abate JA, Henry WI Jr. Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN-gamma in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway. *J Immunol* 147: 144-148, 1991.

222. Becker WK, Shippee RL, McManus AT, Mason AD Jr, Pruitt BA Jr. Kinetics of nitrogen oxide production following experimental thermal injury in rats. *J Trauma* 34: 855-862, 1993.
223. Carter EA, Derojas-Walker T, Tamir S, Tannenbaum SR, Yu YM, Tompkins RG. Nitric oxide production is intensely and persistently in tissue by thermal injury. *Biochem J* 304: 201-204, 1994.
224. Preiser J, Reper P, Vlasselaer D, Vray B, Zhang H, Metz G, Vandderkelen A, Vincent JL. Nitric oxide production is increased in patients after burn injury. *J Trauma* 40: 368-371, 1996.
225. Masson I, Mathieu J, Nolland XB, De Sousa M, Chanaud B, Strzalko S, Chancerelle Y, Kergonou JF, Giroud JP, Florentin I. Role of nitric oxide in depressed lymphoproliferative responses and altered cytokine production following thermal injury in rats. *Cell Immunol* 186: 121-132, 1998.
226. Tchervenkov JI, Latter DA, Psychogios J, Christou NV. Altered leukocyte delivery to specific and non-specific inflammatory skin lesions following burn injury. *J Trauma* 25:582-588, 1988.
227. Chandra RK. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *Am J Clin Nutr* 53: 1087-1101, 1991.
228. De-Souza DA, Greene LJ. Pharmacological nutrition after burn injury. *J Nutr* 128: 797-803, 1998.
229. Wilmore DW, Aulick LH. Systemic response to injury and the healing wound. *JPEN* 4: 147-151, 1980.
230. Montegut WJ, Lowry SF. Nutrition in burn patient. *Sem in Nephrology* 13 : 400-408, 1993.
231. Demling RN. Burns. *N Engl J Med* 313: 1389-1398, 1985.
232. Fürst P. New strategies in clinical nutrition. *Perit Dial Inter* 16: S28-S35, 1996.
233. Moore FA, Feliciano DV, Andrassy RJ, McArdle AH, Booth F, Morgenstein-Wagner TB, Kellum JM, Welling RE & Moore EE. Early enteral feeding, compared with parenteral, reduces postoperative septic complications. *Ann Surg* 216: 172-183, 1992.

234. Ziegler TR. Molecular mechanisms of intestinal-injury, repair, and growth. In: Gut dysfunction in critical illness. Rombeau JL & Takalaa J, eds. Pp 25-52 Springer-Verlag, Berlin, Germany. 1996.
235. Ziegler TR, Estivariz CF, Jonas CR, Jones DP, Leader LM. Interactions between nutrients and peptic growth factors in intestinal growth, repair, and function. JPEN 23 : S174-S183, 1999.
236. Garrel DR, Davignon I, Lopez D. Length of care in patients with severe burns with or without early enteral nutritional support. J Burn Care Rehabil 12:85-90, 1991.
237. Charielli A, Enzi G, Casadei A, Baggio B, Valerio A, Mazzoleni F. Very early nutrition supplementation in burn patients. Am J Clin Nutr 51: 1035-1039, 1990.
238. Saito H, Trocki O, Alexander JW, Kopcha R, Heyd T, Joffe SN. The effect of route of nutrient administration on the nutritional status, catabolic hormone secretion, and gut mucosal integrity after burn injury. JPEN 11: 1-7, 1987.
239. Alverdy J, Chi HS, Sheldon GF. The effect of parenteral nutrition on gastrointestinal immunity: the importance of enteral stimulation Ann Surg 202: 681-684, 1985.
240. Mochizuki H, Trocki O, Dominioni L, Brackett KA, Joffe SN, Alexander JW. Mechanisms of prevention of postburn hypermetabolism and catabolism by early enteral feeding. Ann Surg 200: 297-310, 1984.
241. Sugiura T, Tashiro T, Yamamori H, Takagi K, Hayashi N, Itabashi T, Toyoda Y, Sano W, Nitta H, Hirano J, Nakajima N, Ito I. Effects of total parental nutrition on endotoxin translocation and extent of the stress response in burned rats. Nutrition 15: 570-575, 1999.
242. Maeijma K, Deitch EA, Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of rats receiving thermal injury. Infect Immun 43: 6-10, 1984.
243. Alexander JW, Bruce G, MacMillan MD, Dwight-Stinnet J, Corak O, Bozian RC, Fisher JE, Oakes JB, Morris MJ, Krummel R. Beneficial effects of aggressive protein feeding in severely burned children. Ann Surg. 192: 505-517, 1980.

244. Gottschlich MM, Jenkins M, Warden GD, Baumer T, Havens P, Snook JT, Alexander JW. Differential effects of three enteral dietary regimens on selected outcome variables in burn patients. *JPEN* 14: 225-236, 1990.
245. Patterson BW, Nguyen T, Pierre E, Herndon DN, Wolfe RR. Urea and protein metabolism in burned children : effect of dietary protein intake. *Metabolism* 46: 573-578, 1997.
246. Mitch WE, Goldberg AL. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin proteasome pathway. *N Engl J Med* 335: 1897-1905, 1996.
247. Alexander J, Saito H, Trocki O, Ogle CK. The importance of lipid in the diet after burn injury. *Ann Surg* 204:1-8, 1986.
248. Welbourne TC, King A, Horton K. Enteral glutamine supports hepatic glutathione efflux during inflammation. *J Nutr Biochem* 4: 236-241 , 1993.
249. Rohde T, MacLean DA, Klarlund Pedersen B. Glutamine, lymphocyte proliferation and cytokine production. *Scand J Immunol* 44: 648-650 , 1996.
250. Szondy Z, Newsholme EA. The effects of various concentrations of nucleobases, nucleosides or glutamine on the incorporation of [3H] thymidine into DNA in rat mesenteric-lymph-node lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin. *Biochem J* 270: 437- , 1990.
251. Yaqoob P, Calder PC. Glutamine requirement of proliferating T lymphocytes. *J Nutrition* 13: 646-651, 1997.
252. Parry-Billings M, Evans J, Calder PC, Newsholme EA. Does glutamine contribute to immunosuppression after major burns? *Lancet* 336: 523-525, 1990.
253. Calder PC, Yakoob P. Glutamine and the immune system. *Amino Acids* 17(3): 227-241, 1999.
254. Yaqoob P, Calder PC. Cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells: Differential sensitivity to glutamine availability. *Cytokine* 10: 790-794, 1998.
255. Ruggeberg J, Stalmach E, Zubrod-Eichert C, Wahn V, Schrotten H. Antimicrobial functions of human monocytes depend on concentration of glutamine in vitro. *Ann Nutr Metab* 41: 371-375, 1997.

256. Wallace C, Keast D. Glutamine and macrophage function. *Metabolism* 41:1016-1020, 1992.
257. Abcouver SF, Bode BP, Souba WW. Glucocorticoids regulate glutamine synthetase expression in a tissue-specific manner. *J Surg Res* 59: 59-65, 1995.
258. Mittendorfer B, Gore DC, Herdon DN, Wolfe RR. Accelerated glutamine synthesis in critically ill patients cannot maintain normal intramuscular free glutamine concentration. *JPEN* 23 : 243-250, 1999.
259. Wernerman J, Vinnars E. The effect of trauma and surgery on interorgan fluxes of aminoacids in amn. *Clin Sci* 73: 129-133, 1987.
260. McAnena OJ, Moore FA, Moore EE, Jones TN, Parsons P. Selective uptake of glutamine in the gastrointestinal tract: confirmation in a human study. *Br J Surg* 78: 480-482, 1991.
261. Souba WW, Klimberg V, Plumley DA, Sallourn RM, Flynn TC, Bland KI, Copeland EM 3rd. The role of glutamine in maintaining a healthy gut and supporting the metabolic response to injury and infection. *J Surg Res* 48:383-391, 1990.
262. Deitch EA, Xu DZ, Qi L, Berg RD. Bacterial translocation from the gut impairs systemic immunity. *Surgery* 109: 269-276, 1991.
263. Epstein MC, Banducci DR, Manders EK. The role of the gastrointestinal tract in the development of burn sepsis. *Plast Reconstr Surg* 90: 524-530, 1992.
264. Tenenhaus M, Hansbrough JF, Zapata-Sirvent RL, Ohara M, Nyan W. Supplementation of an elemental diet with alanyl-glutamine decrease bacterial translocation in burn mice. *Burns* 20: 220-225, 1994.
265. Stinnett JD, Alexander JW, Watanabe C, MacMillan BG, Fisher JE, Morris MJ, Trocki O, Miskell P, Edwards L, James H. Plasma and skeletal muscle amino acids following severe burn injury in patients and experimental animals. *Ann Surg* 195: 75-89, 1982.
266. Parry-Billings M, Baigrie RJ, Lamont PM, Morris PJ, Newsholme EA. Effects of major and minor surgery on plasma glutamine and cytokine levels. *Arch Surg* 127: 1237-1240, 1992.

267. Powell H, Castell LM, Parry-Billings M, Desborough JP, Hall GM, Newsholme EA. Growth hormone suppression and glutamine flux associated with cardiac surgery. *Clin Physiol* 14: 569-580, 1994.
268. Jensen GL, Miller RH, Talabiska DG, Fish J, Gianferante L. A double blind, prospective, randomized study of glutamine-enriched compared with standard peptide-based feeding in critically ill patients. *Am J Clin Nutr* 64: 615-621, 1996.
269. Milewski PJ, Threlfall CJ, Health DF, Holbrook IB, Wilford K, Irving MH. Intracellular free amino acids in undernourished patients with and without sepsis. *Clin Sci* 62: 83-91, 1982.
270. Parry-Billings M, Budgett R, Koutedakis Y, Blomstrand E, Brooks S, Williams C, Calder PC, Pilling S, Baigrie R, Newsholme EA. Plasma amino acid concentrations in the overtraining syndrome: possible effects on the immune system. *Med Sci Sports Exer* 24: 1353-1358, 1992.
271. Hack V, Weiss C, Friedmann B, Suttner S, Schykowski M, Erbe N, Benner A, Bartsh P, Droge W. Decreased plasma glutamine level and CD4+ T cell number in response to 8 wk of anaerobic training. *Am J Physiol* 272: E788-795, 1997.
272. Newsholme EA, Newsholme P, Curi R, Crabtree B, Ardawi MSM. Glutamine metabolism in different tissues: its physiological and pathological importance. In: Kinney JM, Borum PR, eds. *Perspectives in clinical nutrition*. Baltimore: Urban and Schwarzenberg. 71, 1989.
273. Newsholme EA, Calder PC. The proposed role of glutamine in some cells of the immune system and speculative consequences for the whole animal. *Nutrition* 13: 728-730, 1997.
274. Ziegler T, Wilmore D. Clinical and metabolic efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition after bones marrow transplantation. *Ann Inter Med* 116:821-828, 1992.
275. Stehle P, Wurste N, Puchestein C, Zander J, Albers S, Lawin P. Effect of parenteral glutamine peptide supplements on muscle glutamine loss and nitrogen balance after major surgery. *Lancet* 1: 231-233, 1989.
276. Scheppach W, Loges C, Bartran P, Christich SV, Richter F, Dusel G, Stehle P, Fürst P, Kasper H. Effects of free glutamine and alanyl-glutamine dipeptide on



- mucosal proliferation of the human ileum and colon. *Gastroenterology* 107: 429-434, 1994.
277. Van der Hulst RRWJ, van Kreel BK, von Mevenfeldt MF, Brummer RM, Arends J, Deutz NEP, Soeters PB. Glutamine and the preservation of gut integrity. *Lancet* 341: 1363-1365, 1993.
278. Van der Hulst RRWJ, von Mevenfeldt MF, Soeters PB. Glutamine: A gut essential amino acid. In: *Gut Dysfunction in critical illness*. Rombeau JL & Takala J. eds. Pp. 318-330. Springer-Verlag, Berlin, Germany. 1996.
279. Fürst P. The role of antioxidants in nutritional support. *Proc Nutr Soc* 55: 945-961, 1996.
280. Ogle CK, Ogle JD, Mao JX, Simon J, Noel JG, Li BG, Alexander JW. Effect of glutamine on phagocytosis and bacterial killing by normal and pediatric burn patient neutrophils. *J Parenter Enteral Nutr* 18: 128-133, 1994.
281. Saito H, Furukawa S, Matsuda T. Glutamine as an immunoenhancing nutrient. *J Parenter Enteral Nutr* 23: S59-S61, 1999.
282. Furukawa S, Saito H, Fukatsu K, Hashiguchi Y, Inaba T, Lin MT, Inoue T, Han I, Matsuda T, Muto T. Glutamine-enhanced bacterial killing by neutrophils from postoperative patients. *Nutrition* 13: 863-869, 1997.
283. Furukawa S, Saito H, Inoue T, Matsuda T, Fukatsu K, Han I, Ikeda S, Hidemura A. Supplemental glutamine augments phagocytosis and reactive oxygen intermediate production by neutrophils and monocytes from postoperative patients in vitro. *Nutrition* 16: 323-329, 2000.
284. Kromann N, Green A. Epidemiological studies in the Upernavik District, Greenland. *Acta Medica Scandinava*. 208: 401-406, 1980.
285. Sperling RI, Weinblatt ME, Robin JL, Ravalese J, Hoover RL, House F, Coblyn JS, Fraser PA, Spur BW, Robinson DR, Lewis RA, Austen KF. Effects of dietary supplementation with marine fish oil on leucocyte lipid mediator generation and function in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 30: 987-988, 1987.
286. Bates D, Cartlidge NEF, French JM, Jackson MJ, Nightingale S, Shaw DA, Smith S, Woo E, Hawkins SA, Millar JHD, Belin J, Conroy DM, Gill SK, Sidey M, Smith AD, Thompson RHS, Zilkha K, Gale M, Sinclair HM. A double-blind

- controlled trial of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 52: 18-22, 1989.
287. Das UN. Beneficial effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the management of systemic lupus erythematosus and its relationship to the cytokine network. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 51: 207-213, 1994.
288. De Pablo MA, De Cienfuegos GA. Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. *Immunol Cell Biol* 78: 31-39, 2000.
289. Schulz H. Beta oxidation of fatty acids. *Biochim Biophys. Acta* 1081: 109-120, 1991.
290. Guzman M, Geelen MJH. Regulation of fatty acid oxidation in mammalian liver. *Biochim Biophys Acta* 1167: 227-241, 1993.
291. Brenner RR. Effect of unsaturated fatty acids on membrane structure and enzyme kinetics. *Prog Lipid Res* 23: 69-96, 1984.
292. Hwang D. Essential fatty acids and the immune response. *FAASEB J* 2: 2053-2061, 1989.
293. Speizer LA, Watson MJ, Brunton LL. Differential effects of omega-3 fish oils on protein kinase activities in vitro. *Am J Physiol* 261: E109-E114, 1991.
294. Linscheer WG, Vergroessen AJ. Lipids. In: *Modern Nutrition in Health and disease*. Chapter 4. 9<sup>TH</sup> Edition. Shils, Olson, Shike, Ross Ed. p.67-94, 1999.
295. Lin LL, Lin AY, DeWitt DL. IL-1 $\alpha$  induces the accumulation of cPLA<sub>2</sub> and the release of PGE<sub>2</sub> in human fibroblastes. *J Biol Chem* 267: 451-454, 1992.
296. Gronich JH, Boventer JV, Nemonoff RA. Purification of a high-molecular-mass form of phospholipase A<sub>2</sub> from rat kidney activated at physiological calcium concentrations. *Biochem J* 271: 37-43, 1990.
297. Takayama K, Kudo I, Kim DK, Nagata K, Nozawa Y, Inoue K. Purification and caractérisation of human platelet phospholipase A<sub>2</sub> which preferentially hydrolyses an arachidonoyl residue. *FESEB Lett* 282: 326-330, 1991.
298. Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA<sub>2</sub> contains a Ca<sup>2+</sup> dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell* 65: 1043-1051, 1991.

299. Poulos A. Very long chain fatty acids in higher animals. A review. *Lipids* 30: 1-14, 1995.
300. Murphy MG. Studies of the regulation of basal adenylate cyclase activity by membrane polyunsaturated fatty acids in cultures neuroblastoma. *J Neurochem* 47: 245-253, 1986.
301. Calder PC. Dietary fatty acids and the immune system. *Nutrition Reviews* 56 : S70-S83, 1998.
302. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 38: 97-120, 1998.
303. Otto JC, Smith WL. Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. *J Lipid Mediat Cell Signal* 12: 139-156, 1995.
304. Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenase-2 and its regulation in inflammation. *Mediat Inflamm* 5: 305-323, 1996.
305. Endo TF, Ogushi S, Sone S. LPS-dependent cyclooxygenase-2 induction in human monocytes is down-regulated by IL-13, but not by IFN- $\gamma$ . *J Immunol* 156: 2240-2246, 1996.
306. Phillips TA, Kujubu DA, Mackay RJ, Herschman HR, Russell SW, Pace JL. The mouse macrophage activation-associated marker protein, p71/73, is an inducible prostaglandin endoperoxidase synthase (cyclooxygenase). *J Leucocyte Biol* 53: 411-419, 1993.
307. Hinson RM, Williams JA, Shacter E. Elevated interleukin-6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 93: 4885-4890, 1996.
308. Ryseck RP, Raynoschek C, Macdonald-Bravo H, Dorfman K, Mattei MG, Bravo R. Identification of an immediate early gene, pghs-B, whose protein products has prostaglandin synthase/cyclooxygenase activity. *Cell growth differ* 3: 443-450, 1992.
309. Kujubu DA, Reddy ST, Fletcher BS, Herschman HR. Expression of the protein product of the prostaglandin synthase-2/T1S10 gene in mitogen-stimulated Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem.* 268: 5425-5430, 1993.

310. DuBois RN, Tsujii M, Bishop P, Awad JA, Makita K, Lanahan A. Cloning and characterization of a growth factor-inducible cyclooxygenase gene from rat intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 266: G822-G827, 1994.
311. Habib A, Creminon C, Frobert Y, Grassi J, Pradelles P, Maclouf J. Demonstration of an inducible cyclooxygenase in human endothelial cells using antibodies raised against the carboxyl-terminal region of the cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 268: 23448-23454, 1993.
312. Mohrhauer H, Holman RT. The effect of dose level of essential fatty acids upon fatty acid composition of the rat liver. *J Lipid Res* 4: 151-159, 1963.
313. Marshall LA, Johnston PV. The effect of dietary  $\alpha$ -linolenic acid in the rat on fatty acid profiles of immunocompetent cell populations. *Lipids* 18: 737-742, 1983.
314. Burns CP, Rosenberger JA, Luttenegger DG. Selectivity in modification of the fatty acid composition of normal mouse tissues and membranes in vivo. *Ann Nutr Metab* 27: 268-277, 1983.
315. Buttke TM, Mallet GS, Meydrech EF. Influence of dietary lipids on the fatty acid profiles of mouse B and T lymphocytes. *Nutr Reports Intl.* 32: 749-756, 1985.
316. Valette L, Croset M, Prigent AF, Meskini N, Lagarde M. Dietary polyunsaturated fatty acids modulates fatty acid composition and early activation steps of concanavalin A stimulated rat lymphocytes. *J Nutr* 121: 1844-1859, 1991.
317. Chapkin RS, Somers SD, Erickson KL. Inability of murine peritoneal macrophages to convert linoleic acid into arachidonic acid. *J Immunol* 140: 2350-2355, 1988.
318. Brenner RR. Nutritional and hormonal factors influencing desaturation of essential fatty acids. *Prog Lipid Res* 20: 41-47, 1981.
319. Traill KN, Wick G. Lipids and lymphocyte function. *Immunol Today* 5:70-76, 1984.
320. Meade CJ, Mertin J. Fatty acids and immunity. *Adv Lipid Res* 16:127-165, 1978.
321. Meade CJ, Mertin J, Sheena H, Hunt R. Reduction by linoleic acid of the severity of experimental allergic encephalomyelitis in the guinea pig. *J Neurol Sci* 35: 291-308, 1978.

322. Tsang WM, Belin J, Monro JA, Smith AD, thompson RH, Zilkha KJ. Relationship between plasma and lymphocyte linoleate in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 39: 767-771, 1976.
323. Jeffery NM, Sanderson P, Newsholme EA, Calder PC. Characteristics of lipid and lymphocytes collected from the lymph of rats fed a low fat diet or high fat diets rich in n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids. *Nutr Res* 18:299-308, 1998.
324. Calder PC, Bond JA, Bevan SJ, Hunt SV, Newsholme EA. Effect of fatty acids on the proliferation of concanavalin A-stimulated rat lymph node lymphocytes. *Intern J Biochem* 23: 579-588, 1991.
325. Calder PC, Bevan SJ, Newsholme EA. The inhibition of T-lymphocyte proliferation by fatty acids is via an eicosanoid-independent mechanism. *Immunology* 75: 108-115, 1992.
326. Calder PC, Yaqoob P, Newsholme EA. Triacylglycerol metabolism by lymphocytes and the effect of triacylglycerols upon lymphocyte proliferation. *Biochem J* 298: 605-611, 1994.
327. Calder PC, Newsholme EA. Unsaturated fatty acids suppress interleukin-2 production and transferrin receptor expression by concanavalin A-stimulated rat lymphocytes. *Mediators of Inflammation* 1: 107-115, 1992.
328. Calder PC, Newsholme EA. Polyunsaturated fatty acids suppress human peripheral blood lymphocyte proliferation and interleukin-2 production. *Clinical Science* 82: 695-700, 1992.
329. Kumar GS, Das UN, Kumar KV, Madhavi N, Das NP, Tan BKH. Effect of n-6 and n-3 fatty acids on the proliferation of human lymphocytes and their secretion of TNF- $\alpha$  and IL-2 in vitro. *Nutrition Research* 12: 815-823, 1992.
330. Soyland E, Nenseter MS, Braathen L, Drevon CA. Very long chain n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids inhibit proliferation of human T-lymphocytes in vitro. *Eur J Clin Invest* 23: 112-121, 1993.
331. Yamashita N, Maruyama M, Yamazaki, K, Hamazaki T, Yano S. Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on natural killer cell activity in human peripheral blood lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 59: 335-345, 1991.

332. Fujikawa M, Yamashita N, Yamazaki K, Sugiyama E, Suzuki H, Hamazaki T. Eicosapentaenoic acid inhibits antigen-presenting cell function of murine splenocytes. *Immunology* 75: 330-335, 1992.
333. Rotondo D, Earl CRA, Laing KJ, Kaimakamis D. Inhibition of cytokine-stimulated thymic lymphocyte proliferation by fatty acids: the role of eicosanoids. *Biochim Biophys Acta* 1223: 185-194, 1994.
334. Calder PC, Newsholme EA. Influence of antioxidant vitamins on fatty acid inhibition of lymphocyte proliferation. *Biochem Molec Biol Int.* 29: 175-183, 1993.
335. Hummell DS. Dietary lipids and immune function. *Progress in Food and Nutrition Science.* 17: 287-329, 1993.
336. Kelly JP, Parker CW. Effect of arachidonic acid and other unsaturated fatty acids on mitogenesis in human lymphocytes. *J Immunol* 122: 1556-1562, 1979.
337. Kollmorgen GM, Sansing WA, Lehman AA, Fisher G, Longley RE, Alexander SS Jr, King MM, McCay PB. Inhibition of lymphocyte function in rats fed high-fat diets. *Cancer Res* 39: 3458-3462, 1979.
338. Erickson KL, McNeill CJ, Gershwin ME, Ossmann JB. Influence of dietary fat concentration and saturation on immune ontogeny in mice. *J Nutr* 110: 1555-1572, 1980.
339. Friend JV, Lock SO, Gurr MI, Parish WE. Effect of different dietary lipids on the immune responses of Hartley strain guinea pigs. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 62: 292-301, 1980.
340. Levy JA, Ibrahim AB, Shirai I, Ohta K, Wagasawa R, Yoshida H, Esles J, Ganther M. Dietary fat affects immune response production of antiviral factors and immune complex disease in NZB/NZW mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 1974-1978, 1982.
341. Locniskar M, Nauss KM, Newberne PM. The effect of quality and quantity of dietary fat on the immune system. *J Nutr* 113: 951-961, 1983.
342. Morrow WJW, Ohashi Y, Hall J, Pribnow J, Hirose S, Shirai T, Levy JA. Dietary fat and immune function. I. Antibody responsees, lymphocyte and accessory cell function in (NZB x NZW)F1 mice. *J Immunol* 135: 3857-3863, 1985.

343. Olson LM, Clinton SK, Everitt JI, Johnson PV, Wisek WJ. Lymphocyte activation, cell-mediated cytotoxicity and their relationship to dietary fat-enhanced mammary tumorigenesis in C3H/OUJ mice. *J Nutr* 117: 955-963, 1987.
344. Alexander NJ, Smythe NL. Dietary modulation of in vitro lymphocyte function. *Ann Nutr Metab* 32: 192-199, 1988.
345. De Deckere EAM, Verplanck CJ, Blonk CG, Van Wielsen WG. Effects of type and amount of dietary fat on rabbit and rat lymphocyte proliferation in vitro. *J Nutr* 118: 11-18, 1988.
346. Berger A, German JB, Chiang BL, Ansari AA, Keen CL, Fletcher MP, Gershwin ME. Influence of feeding unsaturated fats on growth and immune status of mice. *J Nutr* 123: 225-233, 1993.
347. Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. The effect of dietary lipid manipulation on rat lymphocyte subsets and proliferation. *Immunology* 82: 603-610, 1994.
348. Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. Influence of cell culture conditions on diet-induced changes in lymphocyte fatty acid composition. *Biochim Biophys Acta* 1255: 333-340, 1995.
349. Yaqoob P, Calder PC. Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cell Immunol.* 163: 120-128, 1995.
350. Nirgiotis JG, Hennersey PJ, Black CT, Andressy RH. Low-fat, high carbohydrate diets improve wound healing and increase protein levels in surgically stressed rats. *J Ped Surgery* 26: 925-929, 1991.
351. Beisel WR, Fisher RH. Lipid metabolism during infectious illness. *Am J Clin Nutr.* 23: 1069-1079, 1970.
352. Newberne PM. Overnutrition and resistance of dogs to distemper virus. *Fed Proc* 25: 1701-1712, 1966.
353. Sanderson P, Yaqoob P, Calder PC. Effects of dietary lipid manipulation upon rat spleen lymphocyte functions and the expression of lymphocyte surface molecules. *J Nutr-Environ Med* 5: 119-132, 1995.
354. Ossman JB, Erickson KL, Cantoly NL. Effects of saturation and concentration of dietary fats on lymphocyte transformation in mice. *Nutr Rep Int* 22: 279-284, 1980.

355. Fritsche KL, Caasity NA, Huang S-C. Effect of dietary fat source on antibody production and lymphocyte proliferation in chickens. *Poultry Sci* 70: 611-617, 1991.
356. Marshall LA, Johnston PV. The influence of dietary essential fatty acids on rat immunocompetent cell prostaglandin synthesis and mitogen-induced blastogenesis. *J Nutr* 115: 1572-1580, 1985.
357. Kramer TR, Briske-Anderson M, Johnson SB, Holma RT. Influences of dietary polyunsaturated or saturated fatty acids and of concanavalin A upon proliferation of spleen lymphoid cells from rats. *Nutr Res* 6: 1219-1227, 1986.
358. Jeffery NM, Sanderson P, Newsholme EA, Calder PC. Effects of varying the type of saturated fatty acid in the rat diet upon serum lipid levels and spleen lymphocyte functions. *Biochim Biophys Acta* 1345: 223-226, 1997.
359. DeWille JW, Fraker PJ, Romsos DR. Effect of dietary fatty acids on delayed-type hypersensitivity in mice. *J Nutr* 111: 2039-2043, 1981.
360. Erickson KL, Adams DA, Scibienski RJ. Dietary fatty acid modulation of murine B-cell responsiveness. *J Nutr* 116: 1830-1840, 1986.
361. DeWille JW, Fraker PJ, Romsos DR. Effects of essential fatty acid deficiency, and various levels of polyunsaturated fatty acids on humoral immunity in mice. *J Nutr* 109: 1018-1027, 1979.
362. DeWille JW, Fraker PJ, Romsos DR. Effects of fatty acids on delayed-type hypersensitivity in mice. *J Nutr* 111: 2039-2043, 1981.
363. Adams DA, Freauff SJ, Erickson KI. Biophysical characterization of dietary lipid influences on lymphocytes. In: *Pharmacological effects of lipids*. Vol 2. Kabara J (Ed). Amsterdam, Martinus Nijhoff, 1983.
364. Kelley DS, Nelson GJ, Serrato CM, Schmidt PC, Branch LB. Effects of type of dietary fat on indices of immune status of rabbits. *J Nutr* 118: 1376-1384, 1988.
365. Meydani SN, Nicolosi RJ, Hayes KC. Effect of long-term feeding of corn-oil or coconut oil diets on immune response and prostaglandin E2 synthesis of squirrel and cebus monkeys. *Nutr Res* 5: 993-1002, 1985.
366. Cathcart ES, Leslie CA, Meydani SN, Hayes KC. A fish oil diet retards experimental amyloidosis, modulates lymphocyte function and decreases macrophage arachidonate metabolism in mice. *J Immunol* 139: 1850-1854, 1987.



367. Moussa M, Tkaczuk J, Ragab J, Garcia J, Abbal M, Ohayon E, Ghisolfi J, Thouvenot JP. Relationship between the fatty acid composition of rat lymphocytes and immune functions. *Br J Nutr* 83: 327-333, 2000.
368. Jeffery NM, Cortina M, Newsholme EA, Calder PC. Effects of variations in the proportions of saturated, monosaturated and polyunsaturated fatty acids in the rat diet on spleen lymphocyte functions. *Br J Nutr* 77: 805-823, 1997.
369. Kelley DS, Branch LB, Lacono JM. Nutritional modulation of human status. *Nutr Res* 9: 965-975, 1989.
370. Kelley DS, Dougherty RM, Branch LB, Taylor PC, Iacono JM. Concentration of dietary n-6 polyunsaturated fatty acids and human immune status. *Clin Immunol Immunopathol* 62: 240-244, 1992.
371. Meydani SN, Endres S, Woods MM, Goldin BR, Soo C, Morrill-Labrode A, Pinarello CA, Gorbach SL. Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *J Nutr* 121: 547-555, 1991.
372. Meydani SN, Lichenstein AH, Cornwall S, Meydani M, Goldin BR, Rasmussen H, Dinarello CA, Schaefer EJ. Immunologic effects of National Cholesterol Education Panel (NCEP) step-2 diets with and without fish-derived n-3 fatty acid enrichment. *J Clin Invest* 92: 105-113, 1993.
373. Endres S, Meydani SN, Ghorbani R et al. Dietary supplementation with n-3 fatty acids suppresses interleukin-2 production and mononuclear cell proliferation. *J Leuk Biol* 54: 599-603, 1993.
374. Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids. *Immunol Letts* 41: 241-247, 1994.
375. Barone J, Hebert JR, Reddy MM. Dietary fat and natural killer cell activity *Am J Clin Nutr* 50: 861-867, 1989.
376. Hebert JR, Barone J, Reddy MM, Backlund JY. Natural killer cell activity in a longitudinal fat intervention trial. *Clin Immunol immunopathol* 54: 103-116, 1990.
377. Stewart-Phillips JL, Laugh J, Phillips NC. The effect of high fat on murine macrophage activity. *Int J Immunol* 13: 325-332, 1991.

378. De Pablo MA, Ortega E, Gallego AM, Alvarez C, Pancorbo PL, Alvarez de Cienfuegos. The effect of dietary fatty acid manipulation on phagocytic activity and cytokine production by peritoneal cells from Balb/c mice. *J Nutr Sci Vitaminol* 44: 57-67, 1998.
379. Calder PC, Bond JA, Harvey DJ, Gordon S, Newsholme EA. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. *Biochem J* 269: 807-814, 1990.
380. Chapkin RS, Somers SD, Erikson KL. Dietary manipulation of macrophage phospholipid classes: selective increase in dihomogamma linolenic acid. *Lipids* 23: 766-770, 1988.
381. Somers SD, Chapkin RS, Erikson KL. Alteration of in vitro peritoneal macrophage function by dietary enrichment with eicosapentaenoic acid and docosahexanoic acids in menhaden fish oil. *Cell Immunol* 123: 201-211, 1989.
382. Goodwin JS, Ceuppens J. The regulation of immune responses by prostaglandins. *J Clin Immunol* 3: 295-308, 1983.
383. Hwang D. Essential fatty acids and the immune response. *FASEB J* 3: 2052-2061, 1989.
384. Kinsella JE, Lokesh B, Broughton S, Whelan J. Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoids: potential effects on the modulation of inflammatory and immune cells – an overview. *Nutrition* 6: 24-44, 1990.
385. Rappaport RS, Dodge GR. Prostaglandin E inhibits the production of human interleukin-2. *J Exp Med* 155: 943-948, 1981.
386. Walker C, Kristensen F, Bettens F, DeWeck AL. Lymphokine regulation of activated (GI) lymphocytes. I. Prostaglandin E2-induced inhibition of interleukin-2 production. *J Immunol* 130: 1770-1773, 1983.
387. Chouaib S, Welte K, Mertelsmann R, Dupont B. Prostaglandin E2 acts at two distinct pathways of T-lymphocyte activation: inhibition of interleukin-2 production and down-regulation of transferrin receptor expression. *J Immunol* 135: 1172-1179, 1985.

388. Mary D, Aussel C, Ferrua B, Fehlmann M. Regulation of interleukin 2 synthesis by AMPc in human T cells. *J Immunol* 139: 1179-1184, 1987.
389. Vercammen C, Ceuppens JL. Prostaglandin E2 inhibits human T-cell proliferation after crosslinking of the CD3-Ti complex by directly affecting T cells at an early step of the activation process. *Cell Immunol* 104: 24-36, 1987.
390. Bailey JN. Eicosanoids and aspirin in immune cell function. *Biol Essays* 3: 60-66, 1985.
391. Betz M, Fox BS. Prostaglandin E2 inhibits production of T<sub>h</sub>1 lymphokines but not of T<sub>h</sub>2 lymphokines. *J Immunol* 146: 108-113, 1991.
392. Snijdewint FGM, Kalinski P, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg. Prostaglandin E<sub>e</sub> differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *J Immunol* 150: 5321-5329, 1993.
393. Grimble RF. The modulation of immune function by dietary fat. *Br J Intensive Care* 4:159-167, 1994.
394. Rnier G, Skamene E, de Sanctis J, Radzioch D. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids prevent development of atherosclerotic lesions in mice: modulation of macrophage secretory activities. *Arterioscler Thomb* 13: 1515-1524, 1993.
395. Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ. The effect on human tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 1 $\beta$  production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr* 63: 116-122, 1996.
396. De Caterina R, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone MA, Libby P. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Tromb* 14: 1829-1836, 1994.
397. Hughes DA, Southon S, Pinder AC. (n-3) polyunsaturated fatty acids modulate the expression of functionally associated molecules on human monocytes in vitro. *J Nutr* 126: 603-610, 1996.
398. Khalfoun B, Thibault G, Bardos P, Lebranchu Y. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human lymphocytes-endothelial cell adhesion. *Transplantation* 62:1649-1657, 1996.

399. Sanderson P, Yaqoob P, Calder PC. Effects of dietary lipid manipulation upon graft vs host and host vs graft responses in the rat. *Cell Immunol* 164: 204-247, 1995.
400. Hughes DA, Pinder AC, Piper Z, Johnson IT, Lund EK. Fish oil supplementation inhibits the expression of major histocompatibility complex class II molecules and adhesion molecule on human monocytes. *Am J Clin Nutr.* 63: 267-272, 1996.
401. Sanderson P, Calder PC. Dietary fish oil diminishes lymphocyte adhesion to macrophage and endothelial cell monolayers. *Immunol* 94: 79-87, 1998.
402. Grimble RF. Interaction between nutrients, pro-inflammatory cytokines and inflammation. *Clin Sci* 91: 121-130, 1996.
403. Grimble RF, Tappia PS. The modulatory influence of unsaturated fatty acids on the biology of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Biochem Soc Trans* 287:282-286, 1995.
404. Rola-Pleszczynski M, Thivièrge M, Gagnon N, Lacasse C, Stankova J. Differential regulation of cytokine and receptor cytokine genes by PAF, LTB4 and PGE2. *J Lipid Mediat.* 6: 175-181, 1993.
405. Arakawa T, Laneuville O, Miller CCA, Lakkides KM, Wingerd BA, DeWitt DL, Smith WL. Prostanoid receptors of murine NIH3T3 and RAW 264-7 cells. Structure and expression of the murine prostaglandin EP4 receptor gene. *J Biol Chem* 271: 29569-29575, 1996.
406. Ogle CK, Guo X, Szczur K, Hartmann S, Ogle JD. Production of tumor necrosis factor, interleukin-6, and prostaglandin-E2 by LPS-stimulated rat bone marrow macrophages after thermal injury: effect of indomethacin. *Inflammation* 18: 175-185, 1994.
407. Komatsu H, Yaju H, Chiba K, Okumoto T. Inhibition by cyclooxygenase inhibition of interleukin-6 production by human peripheral blood mononuclear cell. *Int J Immunopharmacol* 13: 1137-1146, 1991.
408. Anderson GD, Hauser SD, McGarity KL, Bremer ME, Isakson PC, Gregory SA. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverse inflammation and expression of COX-2 and interleukin-6 in rat adjuvant arthritis. *J Clin Invest* 97: 2672-2679, 1996.

409. Portanova JP, Zhang Y, Anderson GD, Hauser SD, Masferrer JL, Seibert K, Gregory SA, Isakson PC. Selective neutralization of prostaglandin E<sub>2</sub> blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. *J Exp Med* 184: 883-891, 1996.
410. Theisen-Popp P, Pape H, Muller-Peddinghaus R. Interleukin-6 (IL-6) in adjuvant arthritis in rats and its pharmacological modulation. *Int J Immunopharmacol* 14: 565-571, 1992.
411. Williams JA, Shacter E. Regulation of macrophage cytokine production by prostaglandin E<sub>2</sub>. *J Biol Chem* 272: 25693-25699, 1997.
412. Ertel W, Morrison MH, Wang P, Ba ZF, Ayala A, Chaudry IH. The complex pattern of cytokines in sepsis. Association between prostaglandins, cachectin, and interleukins. *Ann Surg* 214: 141-148, 1991.
413. Halliwell B. Oxidants and human diseases: some new concepts. *FASEB J* 1: 358-364, 1987.
414. Dillard C, Tappel L. Lipid peroxidation products in biological tissues. *Free Rad Biol Med*. 7: 193-196, 1989.
415. Orada M, Majima T, Miyazawa T, Fujimoto K, Kancola T. The effect of dietary oxidized oils on immunocompetent cells in mice. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1012: 156-160, 1989.
416. Kasiske BL, Keane WF. The role of lipid peroxidation in the inhibition of mononuclear cell proliferation by normal lipoproteins. *J Lipid Res*. 32: 775-781, 1991.
417. Haberland ME, Fless GM, Scanu AM, Fogelman AM. Malondialdehyde modification of lipoprotein (a) produces avid uptake by human monocyte-macrophages. *J Biol Chem* 267: 4143-4151, 1992.
418. Soyland E, Funk J, Rajka G, Sandberg M, Thone P, Rustad L, Helland S, Middelfart K. Effect of dietary supplementation with very long chain n-3 fatty acids in patients with psoriasis. *N Engl J Med* 328: 1812-1816, 1993.
419. Loft S, Thorling EB, Poulsen HE. High fat diet induced oxidative DNA damage estimated by 8-oxo-7,8-dihydro-deoxyguanosine excretion in rats. *Free Radic Res* 29: 595-600, 1998.

420. Djuric Z, Lu MH, Lewis DA, Luongo DA, Chen XW, Heilbrun LK, Reading BA, Duffy PH, Hart RW. Oxidative DNA damage in rats fed low-fat, high fat or calorie-restricted diets. *Toxicol Appl Pharmacol*. 115: 156-160, 1992.
421. Hietanen E, Ahotupa M, Bereziat JC, Bussacchini V, Camus AM, Bartsch H. Elevated lipid peroxidation in rats induced by dietary lipids and N-nitrosodimethylamine and its inhibition by indomethacin monitored via ethane exhalation. *Toxicol Pathol* 15: 93-96, 1987.
422. Carlson LA. Mobilization and utilisation of lipids after trauma: relation to caloric homeostasis. IN *Energy metabolism in trauma*, Porter R Knight J (eds). Proceedings from a Ciba Foundation Symposium. Churchill. London. pp: 155-171, 1970.
423. Wilmore DW. Alterations in protein, carbohydrate, and fat metabolism in injured and septic patients. *J Am Coll Nutr* 2: 3-13, 1983.
424. Mochizuki H, Trocki O, Dominiononi L, Ray MB, Alexander JW. Optimal lipid content for enteral diets following thermal injury. *J Parenter enteral Nutr* 8: 638-646, 1984.
425. Peck MD, Alexander JW, Ogle CK, Babcock GF. The effect of dietary fatty acids on response to pseudomonas infection in burned mice. *J Trauma* 30 : 445-452, 1990.
426. Gollaher CJ, Swenson ES, Mascioli EA, Babayan VK, Blackburn GL, Bistran BR. Dietary fat level as determinant of protein-sparing actions of structured triglycerides. *Nutrition* 8: 348-353, 1992.
427. Selleck KJ, Wan JM, Gollaher CJ, Babayan VK, Bistran BR. Effect of low and high amounts of a structured lipid containing fish oil on protein metabolism in enterally fed burned rats. *Am J Clin Nutr* 60: 216-222, 1994.
428. Weiss A, Shield R, Newton M, Manger B, Imboden J. Ligand receptor interactions required for commitment to the activation of the interleukin 2 gene. *J Immunol* 138: 2169-2176, 1987.
429. Meister AJ. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 263: 17205-17208, 1988.

430. Fong Y, Moldawer LL, Shires GT, Lowry SF. The biological significance of cytokines and their implication in surgical injury. *Surg Gynecol Obstet* 170: 363-378, 1990.
431. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 15: 74-80, 1994.
432. De Brandt JP, Chollet-Martin S, Hernvann A, Lioret N, DuRoure LD, Lim SK, Vanbourdolle M, Guechot J, Sanzy R, Giboudreau J, et al. Cytokine response to burn injury: relationship with protein metabolism. *J Trauma* 36: 624-628, 1994.
433. Drost AC, Burleson DG, Cioffi WG, Mason AD Jr, Pruitt BA Jr. Plasma cytokines after thermal injury and their relationship to infection. *Ann Surg* 218: 74-78, 1993.
434. Kowal-Vern A, Walengra J, Hoppensteadt D, Sharp-Pucci M, Garnelli RL. Interleukin-2 and interleukin-6 in relation to burn wound size in the acute phase of thermal injury. *J Am Coll Surg* 178: 357-362, 1994.
435. Meek M, Munster AM, Winchurch RA, Dickerson C. The Baltimore scale: Measurement of sepsis in patients with burns using a new scoring system. *J Burn Care Rehabil* 12: 564-568, 1991.
436. Struznya J, Pojda Z, Braun B, Chomicka M, Sobiczewska E, Wrembd J. Serum cytokine levels (IL-4, IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF) in burn patients. *Burn* 21: 437-440, 1995.
437. Svoboda P, Kantorova I, Ochmann J. Dynamics of interleukin 1, 2, and tumor necrosis factor alpha in multiple trauma patients. *J Trauma* 36: 336-340, 1994.
438. Abraham E, Regan RF. The effects of hemorrhage and trauma on interleukin-2 production. *Arch Surg* 120: 1341-1344, 1985.
439. Gough DB, Moss NM, Jordan A, etGrbic JT, Rodrick ml, Mannick JA al. Recombinant interleukin-2 (rIL-2) improves immune response and host resistance to septic challenge in thermally injured mice. *Surgery* 104: 292-300, 1988.
440. Smith KA. Interleukin-2: Inception, impact, and implications. *Science* 240:1169-1176, 1988.

441. Chong AS, Scuder P, Grimes WJ, Hersh EM. Tumor targets stimulate IL-2 activated killer cells to produce interferon-gamma and tumor necrosis factor. *J Immunol* 142: 2133- 2139, 1989.
442. Miossec P, Elhamiani M, Edmonds-Alt X, Sany J, Hirn M. Functional studies of soluble low-affinity interleukin-2 receptors in rheumatoid synovial fluid. *Arthritis Rheum* 33: 1688-1694, 1990.
443. Nielsen OH, Ciardelli T, Wu Z, Langholz E, Kirman I. Circulating soluble interleukin-2 receptor  $\alpha$  and  $\beta$  chain in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 90: 1301-1306, 1995.
444. Elg SA, Hill RB, Heldman L, Ramakrishnan S. The *in vitro* effect on T cell function of soluble IL-2R $\alpha$  from advanced ovarian cancer ascites. *Gynecol Oncol* 66: 133-137, 1997.
445. Kay NE, Burton J, Wagner D, Nelson DL. The malignant B cells from B-chronic lymphocytic leukemia patients release TAC-soluble interleukin-2 receptors. *Blood* 72: 447- 450, 1998.
446. Teodorczyk-Injeyan JA, Sparkes BG, Mills BG, Falk RE, Peters WJ. Increase of serum interleukin-2 receptor level in thermally injured patients. *Clin Immunol Immunopathol* 51 : 205-215, 1989.
447. Teodorczyk-Injeyan JA, Sparkes BG, Mills BG, Peters WJ. Soluble interleukin-2 receptor  $\alpha$  secretion is related to altered interleukin 2 production in thermally injured patients. *Burns* 17: 290-295, 1991.
448. Teodorczyk-Injeyan, McRitchie DI, Peters WJ, Lalani S, Girotti MJ. Expression and secretion of IL-2 receptor in trauma patients. *Ann Surg* 212: 202-207, 1989.
449. Teodorczyk-Injeyan JA, Sparkes BG, Peters WJ. Serum interleukin-2 receptor as a possible mediator of immunosuppression after burn injury. *J Burn Care Rehabil* 10:112-118, 1989.
450. Burton J, Kay NE. Does IL-2-receptor expression and secretion in chronic B-cell leukemia have a role in down-regulation of the immune system? *Leukemia* 8: 92-96, 1994.
451. Chilosi M, Semenzato G, Cetto G, Ambrosetti A, Fiore-Donati L, Perona G, Berton G, Lestani M, Scarpa A, Agostini C, et al. Soluble interleukin-2 receptors in



- the sera of patients with hairy cell leukemia: relationship with the effect of recombinant alpha-interferon therapy on clinical parameters and natural killer in vitro activity. *Blood* 70: 1530-1535, 1987.
452. Dummer R, Posseckert G, Sugamura K, Grundmann H, Burg G. Circulating interleukin-2 receptors are a group of multimeric proteins with immunoreactivity for interleukin-2 receptor alpha, beta and gamma chains. *J Interferon Cytokine Res* 16: 315-320, 1996.
453. Wong GH, Clark-Lewis I, McKimm, Breschkin L, Harris AW, Schrader JW. Interferon-gamma induces enhanced expression of Ia and H-2 antigens on B lymphoid, macrophage, and myeloid cell lines. *J Immunol* 131:788-793, 1983.
454. Rodriguez-Zapata M, Salmeron, Manzano L, Salmeron OJ, Prieto A, Alvarez-Mon M. Defective interferon-gamma production by T-lymphocytes from patients with acute brucellosis. *Eur J Clin Invest* 26: 136-140, 1996.
455. Reinhold U, Wehrmann W, Kukel S, Kreysel HW. Evidence that defective interferon-gamma production in atopic dermatitis patients is due to intrinsic abnormalities. *Clin Exp Immunol* 79: 374-379, 1990.
456. Arzt E, Stalla GK. Cytokines: autocrine and paracrine roles in the anterior pituitary. *Neuroimmunomodulation* 3: 28-34, 1996.
457. Kronin V, Vremec D, Shortman K. Does the IL-2 receptor alpha chain induced on dendritic cells have a biological function? *Int Immunol* 10: 237-240, 1998.
458. Nelson DL, Kurman CC. Tageting human IL-2 receptors for diagnosis and therapy. *Proc Soc Exp Biol Med*. 206: 309-311, 1994.
459. Greenberg SJ, Marcon L, Hurwitz BJ, Waldmann TA, Nelson DL. Elevated levels of soluble interleukin-2 receptors in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 319: 1019-1020, 1988.
460. Allgöwer M, Schoenenberger GA, Sparkes BG. Burning the largest organ. *Burn* 21: S7-S47, 1995.
461. Rodriguez MD, Miller CG, Garner WL, Till Go, Guerrero P, Moore NP, Corridore M, Normolle DP, Smith DJ, Remick DG. Correlation of the local and systemic response with clinical outcome following thermal injury. *J Trauma* 4: 684-694, 1993.

462. Geller DA, Freeswick PD, Nguyen D, Nussler AK, Di Silvio M, Shapiro RA, Wang SC, Simmons RL, Billiar TR. Differential induction of nitric synthase in hepatocytes during endotoxemia and the acute-phase response. *Arch Surg* 129: 165-171, 1994.
463. Tunçtan B, Uludag O, Altug S, Abacioglu N. Effects of nitric oxide synthase inhibition in lipopolysaccharide sepsis in mice. *Pharmacol Res* 38: 405-411, 1998.
464. Weber RJ, Pert A. The periaqueductal gray matter mediates opiate-induced immunosuppression. *Science* 245: 188-190, 1988.
465. Carr DJJ, Rogers TJ, Weber RJ. The relevance of opioid receptors on immunocompetence and immune homeostasis. *Proc Soc Exp Biol Med* 213: 248-257, 1996.
466. Williams W, Rice KC, Weber RJ. Nonpeptide opioids: In vivo effects on the immune system. *Natl Inst Drug Abuse Res Monogr Ser* 105: 404-407, 1991.
467. Gomez-Flores R, Weber RJ. Differential effects of buprenorphine and morphine on immune and neuroendocrine functions following acute administration in the rat mesencephalon periaqueductal gray. *Immunopharmacology* 48: 145-156, 2000.
468. Barlow Y. T lymphocytes and immunosuppression in the burned patient: A review. *Burns* 20: 487-490, 1994.
469. Sparkes BG. Immunological responses to thermal injury. *Burns* 23: 106-113, 1997.
470. Bamberger T, Masson I, Mathieu J, Chauvelot-Moachon L, Giroud LP, Florentin I. Nitric oxide mediates the depression of lymphoproliferative responses following burn injury in rats. *Biomed Pharmacother* 46: 495-500, 1992.
471. Molloy RG, Holzheimer R, Nestor M, Collins K, Mannick JA, Rodrick ML. Granulocytes-macrophage colony-stimulating factor modulates immune function and improves survival after experimental thermal injury. *Br J Surg* 82: 770-776, 1995.
472. Hunt JP, Hunter CT, Browstein MR, et al. The effector component of the cytotoxic T-lymphocyte response has a biphasic pattern after burn injury. *J Surg Res* 80: 243-251, 1998.

473. Ashman RS. Lymphocyte activation, in "Fundamental Immunology" (W.E. Paul, Ed), 3<sup>rd</sup> ed., Raven Press, New York, 1985.
474. Kavanagh EG, Kelly JL, Lyons A, Soberg C, Mannick JA, Lederer JA. Burn injury primes naive CD4+ T-cells for an augmented T-helper 1 response. *Surgery* 124: 269-277, 1998.
475. Munster AM, Smith-Meek M, Dickerson C, Winchurch RA. Translocation. Incidental phenomenon or true pathology? *Ann Surg* 218: 321-327, 1993.
476. Marshall JC, Chouristou NV, Meakins JL. The gastrointestinal tract. The "undrained abscess" of multiple organ failure. *Ann Surg* 218: 111-119, 1993.
477. Nones WG, Minei JP, Barber AE, et al. Bacterial translocation and intestinal atrophy after thermal injury and burn wound sepsis. *Ann Surg* 211: 399-405, 1990.
478. Vogel SN, Moore RN, Sipe JD, and Rosenstreich DL. BCG-induced enhancement of endotoxin sensitivity in C3H/HeJ mice. *J Immunol* 124: 2004-2009, 1980.
479. Nguyen TT, Cox CS, Traber DL, et al. Free radical activity and loss of plasma antioxidants, vitamin E, and sulfhydryl groups in patients with burns. The 1993 Moyer Award. *J Burn Care Rehabil* 14: 602-609, 1993.
480. Kelley DS, Daudu PA. Fat intake and immune response. *Prgr Food Nutr Sci.* 17: 41-63, 1993.
481. Faist E, Schinkel C, Simmer S. Update on the mechanisms of immune suppression of injury and immune modulation. *World J Surg.* 20: 454-459, 1996.
482. Tetsuka T, Daphna\_Iken D, Srivastava SK, Baier LD, DuMaine J, Morrison AR. Cross-talk between cyclooxygenase and nitric oxide pathways: prostaglandin E2 negatively modulates induction of nitric oxide synthase by interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91: 12168-12172, 1994.
483. Schwacha MG, Samy TS, Catania RA, Chaudry IH. Thermal injury alters macrophage response to prostaglandin E2: contribution to the enhancement of inducible nitric oxide activity. *J Leuk Biol* 64: 740-746, 1998.
484. Lalonde C, Nayak U, Hennigan J, and Demling R. Anti-oxidants prevent the cellular deficit produced in response to burn injury. *J Burn Care Rehabil* 17: 379-383, 1996.

## **IX. ANNEXES**

# Decreased corticosteroid-binding globulin in burn patients: Relationship with interleukin-6 and fat in nutritional support

Jacques Bernier, PhD; Nathalie Jobin, MSc; Agnès Emptoz-Bonneton, MD; Michel M. Pugeat, MD; Dominique R. Garrel, MD

**Objectives:** To analyze the effect of low-fat nutritional solutions, with or without fish oil, on serum interleukin (IL)-6, and to explore the relationships between IL-6, corticosteroid-binding globulin (CBG; the main cortisol carrier in plasma), and protein metabolism in severely burned adult patients.

**Design:** Randomized, double-blind study with control and low fat-fed groups.

**Setting:** Burn center of Hôtel-Dieu Hospital of Montréal.

**Patients:** Thirty-seven men and women with thermal burn injury over >20% of body surface area and no other known medical condition.

**Interventions:** Within 24 hrs after admission, nutritional support was started through a gastroenteral tube inserted under endoscopic guidance. The goal for energy intake was calculated using the Curreri formula, and was adjusted with biweekly measurements of resting energy expenditure. Patients were randomly assigned to one of the following groups: control (35% of energy as fat); low fat 1 (15% of energy as fat); and low fat 2 (50% of fat in the form of fish oil).

**Measurements and Main Results:** Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and TNF- $\beta$ , IL-6, CBG, and cortisol free fraction were measured

every 3 days for 28 days. Nitrogen balance and urinary 3-methylhistidine excretion were measured daily. IL-6 concentrations were high in all patients, with the highest value ( $460 \pm 111$  units/mL) observed on day 4. Concentrations of IL-6 were higher in control patients than in low fat-fed patients between days 13 and 28, but not between days 1 and 13. Multivariate analysis showed that IL-6, total body surface area burned, and sepsis scores were independent predictors of CBG between days 1 and 13 ( $n = 170$ ;  $p < .00001$ ). High IL-6 concentrations were predictors of low CBG concentrations and high cortisol free fractions. There was no relationship between IL-6, nitrogen balance, and 3-methylhistidine excretion. TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  activity measurements by biological assay showed no correlation with other factors measured.

**Conclusions:** a) Low-fat feeding, with or without fish oil, does not change the early production of IL-6 after burn injury; b) serum IL-6 is negatively correlated with CBG, which supports the hypothesis that this cytokine inhibits hepatic CBG production; and c) IL-6 does not appear to directly influence protein metabolism in burn patients. (Crit Care Med 1998; 26:452-460)

**KEY WORDS:** burns; cytokines; cortisol; inflammation; nutrition; protein metabolism

Severe burns induce a generalized inflammatory response, including increased production of cytokines. Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interleukin

(IL)-1 are early cytokines produced mainly by activated macrophages or monocytes (1). These proinflammatory cytokines induce a second wave of specialized cytokines, such as IL-6 and IL-8 (1). Whereas TNF- $\alpha$  and IL-1 can exert their activity as cell-associated or secreted forms (2), IL-6 exists only in secreted forms and serves a more classic endocrine function. Thus, circulating IL-6 is a better indicator of inflammatory response than other cytokines. IL-6 has pleiotropic activities that play a central role in hepatic acute-phase response and in host defense, and has both inflammatory and anti-inflammatory effects (1, 3). Burn patients have high concentrations of circulating IL-6 (4-9). This finding, along with the role of IL-6 in inflammation, led us to correlate serum IL-6 concentrations with clinical outcomes

and to find indirect evidence for beneficial or detrimental effects of the cytokine in burn patients.

In a previous study (10), we tested the effect of low-fat nutritional support, with or without fish oil, on several biochemical and clinical parameters associated with burn injury. Low-fat feeding shortened the duration of care and decreased the incidence of pneumonia. Inasmuch as *in vitro* concentrations of IL-6 comparable with those found in serum samples from burn patients suppress T cell-mediated immune functions (11) and induce apoptosis in neutrophils (12), the decreased incidence of pneumonia in our low fat-fed patients may be related to lower circulating concentrations of IL-6. Both low-fat feeding and the administration of  $\omega$ -3 fatty acids are thought to decrease inflammation

From the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (Drs. Bernier, Jobin, and Garrel), Pavillon Hôtel-Dieu, Centre des Grands Brûlés, Montréal, PQ, Canada; Faculté de Médecine Université de Montréal (Drs. Jobin and Garrel), Montréal, PQ, Canada; and the Hôpital Antiquaille (Drs. Emptoz-Bonneton and Pugeat), Division Endocrinologie, Université Claude Bernard, Lyon, France.

Supported, in part, by grant 6605-3G12-S2 from The National Health Research and Development Program, Fonds de La Recherche en Santé du Québec, and the Fondation des Pompiers du Québec pour les Grands Brûlés. We are indebted to Sue Hamilton for her technical assistance.

Address requests for reprints to: Dominique R. Garrel, MD, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Centre de Recherche Hôtel-Dieu Montréal, Pavillon Marie de la Ferre, 3850 St-Urbain, Montréal, PQ H2W 1T8, Canada.

Copyright © 1998 by Williams & Wilkins

through inhibition of prostaglandin E<sub>2</sub>, a major mediator of inflammation. Therefore, we tested the hypothesis that low-fat feeding, with or without fish oil, reduces blood concentrations of IL-6.

The relationships of serum IL-6 with cortisol and protein metabolism in burn patients are not known. However, *in vitro*, IL-6 decreases the production of corticosteroid-binding globulin (CBG), the main carrier for cortisol (13), and such an effect *in vivo* would result in increased free fraction of circulating cortisol. Glucocorticoids suppress the immune response (14) and can stimulate the expression of some acute-phase plasma proteins or enhance the effect of cytokines on these proteins (1). In addition, IL-6 increases muscle protein breakdown in rats (15), and transgenic mice with permanently elevated IL-6 production have muscle atrophy (16).

We explored the relationship between serum IL-6, CBG, free cortisol fraction, nitrogen balance, and 3-methylhistidine (3-MH) excretion (a marker of myofibrillar protein breakdown) in burn patients fed low-fat solutions with or without fish oil.

## MATERIAL AND METHODS

**Patients, Patient Care, and Nutritional Support.** Patient characteristics, patient care, and nutritional support were described in a previous article (10). Forty-three adult men and women with thermal burn injury over >20% of their total body surface area (TBSA) and no other known medical condition were recruited. All patients were admitted to the burn center within 24 hrs after injury. The Parkland formula, with lactated Ringer's solution, was used for resuscitation. With the exception of burns on the hands, burn wounds were left without dressing and without antiseptic ointment. The existence of bronchial injury was assessed by bronchoscopy, which was performed in all patients within 3 days after admission. Pain was managed with morphine administered intravenously.

Within 24 hrs after admission, nutritional support was started through a nasogastric tube inserted under endoscopic guidance. The goal for energy intake was calculated using the Curreri formula ( $40 \times \% \text{ TBSA burned} + 25 \times \text{body weight [kg]}$ ) and was adjusted

with biweekly measurements of resting energy expenditure (17). Patients were randomly assigned to receive one of three enteral solutions: a) control group: fat 35% of total calories; carbohydrate 40%; protein 25%; b) low-fat group 1 (LF1): fat 15%; carbohydrate 60%; protein 25%; and c) low-fat group 2 (LF2): fat 15% (50% as fish oil); carbohydrate 60%; protein 25%. The solutions were made for the purpose of the study (Mead Johnson, Ottawa, ON, Canada), and all vitamins and minerals were present in identical concentrations in the three solutions (Table 1). Proteins were derived from calcium and sodium caseinate, and fatty acids were derived from soybean oil (80%) and medium-chain triglyceride oil (20%). In control and LF1 solutions, fat was derived from soybean oil (80%) and medium-chain triglyceride oil

(20%); in LF2 solutions, fat was derived from menhaden oil (50%), soybean oil (40%), and medium-chain triglyceride oil (10%). Parenteral solutions with equivalent macronutrient composition were made of a mixture of amino acids (Vamine, Clintec, Mississauga, Ottawa, ON, Canada) and 20% glucose, given with 10% Intralipid® (Kabi-Vitrum, Alameda, CA) solutions. The proportion of fat, carbohydrate, and protein was maintained, regardless of the amount of nutritional support given intravenously. Parenteral nutrition was necessary in all patients. Energy and protein intakes and proportion of energy received enterally and parenterally are shown in Figure 1. The proportion of energy received was the same in each group. Because  $\omega$ -3 fatty acids are not available for parenteral use in Canada, fish oil was administered through the enteral feeding tube to obtain the desired proportion (50%) of fat intake as  $\omega$ -3 fatty acids. This experimental feeding lasted 28 days. All patients received vitamin A (50,000 IU/wk), zinc (10 mg/day), and vitamin C (500 mg/day) as supplements. The protocol was approved by the Ethics Committee of our institution, and written consent was obtained from the patients or their closest relative.

**Blood and Urine Sampling.** Blood was sampled every 3 days between 0700 and 0900 hrs, centrifuged without delay, measured in aliquot portions, and stored at -80°C. Day 1 was the morning after admission. Urine collections (24-hr samples) were obtained throughout the study. Urine volume was determined from weight and density measurements.

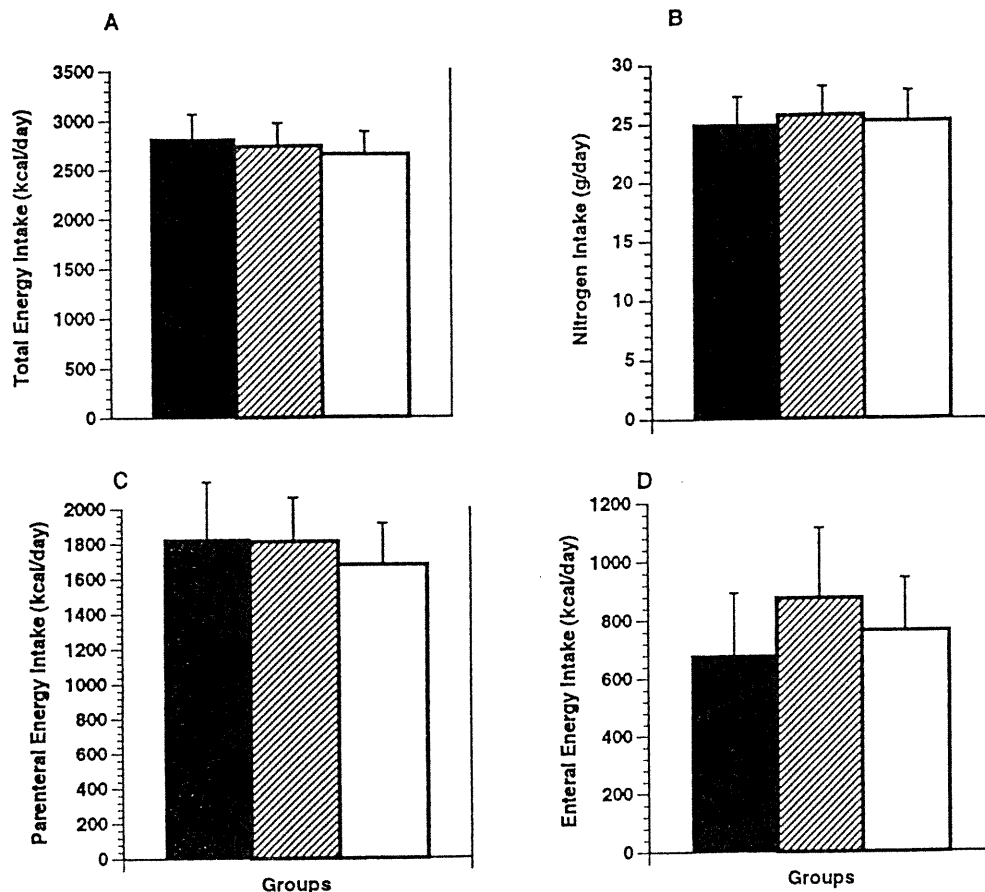
**Biochemistry.** Total urinary nitrogen was measured in all urine collections by chemiluminescence with an analyzer (Antek, Houston, TX). 3-MH was measured by reverse-phase, high-performance liquid chromatography (1090, Hewlett-Packard, Mississauga, ON, Canada) after derivatization with orthophthalaldehyde. Cortisol was measured by radioimmunoassay (Immunocorp, Montreal, PQ, Canada). CBG was measured by radioimmunoassay (18). Free cortisol fraction was measured by equilibrium dialysis (19).

**Measurements of Interleukin-6.** IL-6 was measured with a bioassay, using IL-6-dependent 7TD1 cells (20). Cells were washed three times in RPMI 1640 medium, 10% fetal calf serum without

**Table 1.** Composition of the enteral formulas (amounts/L)

Component	Control	LF1	LF2
Vitamin A (IU)	4230	4230	4230
Vitamin D (IU)	340	340	340
Vitamin E (IU)	64	64	64
Vitamin C (mg)	250	250	250
Vitamin B <sub>1</sub> (mg)	3.2	3.2	3.2
Vitamin B <sub>2</sub> (mg)	3.6	3.6	3.6
Niacin (mg)	42	42	42
Vitamin B <sub>6</sub> (mg)	4.2	4.2	4.2
Folic acid (mg)	0.34	0.34	0.34
D-Panthenic	21.1	21.1	21.1
Vitamin B <sub>12</sub> (ug)	12.7	12.7	12.7
Vitamin K (mg)	0.10	0.10	0.10
Biotin (mg)	0.25	0.25	0.25
Sodium (mg)	690	690	690
Potassium (mg)	1500	1500	1500
Chloride (mg)	1590	1590	1590
Calcium (mg)	1340	1340	1340
Phosphorus (mg)	1070	1070	1070
Magnesium (mg)	300	300	300
Iron (mg)	1.5	1.5	1.5
Iodine (mg)	0.14	0.14	0.14
Copper (mg)	1.6	1.6	1.6
Zinc (mg)	1.2	1.2	1.2
Manganese (mg)	4.4	4.4	4.4
Choline (mg)	42	42	42
Protein (g/L)	62.5	62.5	62.5
Fat (g)	38.9	16.7	16.7
Linoleic acid (g)	19	8.2	3.8
Linolenic acid (g)	0.2	0.9	0.6
EPA (g)	—	—	1.3
DHA (g)	—	—	0.7
Carbohydrate (g)	100	150	150

LF1, low fat without  $\omega$ -3 fatty acids; LF2, low fat with  $\omega$ -3 fatty acids; EPA, eicosapentanoic acid; DHA, docosahexanoic acid.



**Figure 1.** Nutritional characteristics of the patients during the entire period of the study. *A*) mean caloric intake; *B*) mean nitrogen intake; *C*) mean caloric parenteral intake; and *D*) mean caloric enteral intake. There was no significant difference between values for total caloric intake and nitrogen intake and for parenteral nutrition and enteral nutrition between the control group (solid bars) and the low-fat groups without fish oil (hatched bars) and with fish oil (open bars). Mean  $\pm$  SEM values.

IL-6. The cell concentration was adjusted to  $2 \times 10^4$  cells/mL, and 100  $\mu$ L of cells was added to each well of a 96-well microtiter plate. Serial dilutions of serum samples were made, and 100  $\mu$ L was added to the wells. Serum was tested in triplicate for each dilution. Recombinant IL-6 (Boehringer Mannheim, Laval, CA) was used to establish a standard curve, and the background response was determined in the absence of IL-6. Cells were incubated for 18 hrs at 37°C, and proliferation was determined by the addition of 20% Alamar blue (Immuncorp) for 8 hrs. Reduction of Alamar blue was determined using absorbance by spectrophotometry with a wavelength of 550 nm (reduced form) and a reference of 600 nm (oxidized form). Data were expressed in units/mL, as compared with the recombinant IL-6 standard. The lower limit of sensitivity of the IL-6 assay was 1.5 units/mL.

**Measurement of Tumor Necrosis Factor.** TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  activity were quantified using TNF-sensitive, actinomycin D-treated murine L929 fibroblasts (20). Murine L929 fibroblasts were seeded at  $5 \times 10^4$ /well in flat-bottomed, 96-well microtiter plates and incubated overnight in a 98.6°F (37°C) 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator. Serial dilutions of test sample or recombinant TNF (50  $\mu$ L) were added to L929 cell monolayers in the presence of 1  $\mu$ g/mL actinomycin D (Sigma Chemical, St. Louis, MO) in triplicate. Plates were incubated for 18 hrs under standard conditions and then harvested. Each well was washed with 200  $\mu$ L of 0.9% saline solution, and 50  $\mu$ L of 0.05% crystal violet in 20% ethanol was added for 10 mins. Plates were rinsed with cold tap water and dried overnight. To score the plates for TNF activity, 100  $\mu$ L of 100% methanol was added to elute stain from the cells, and absor-

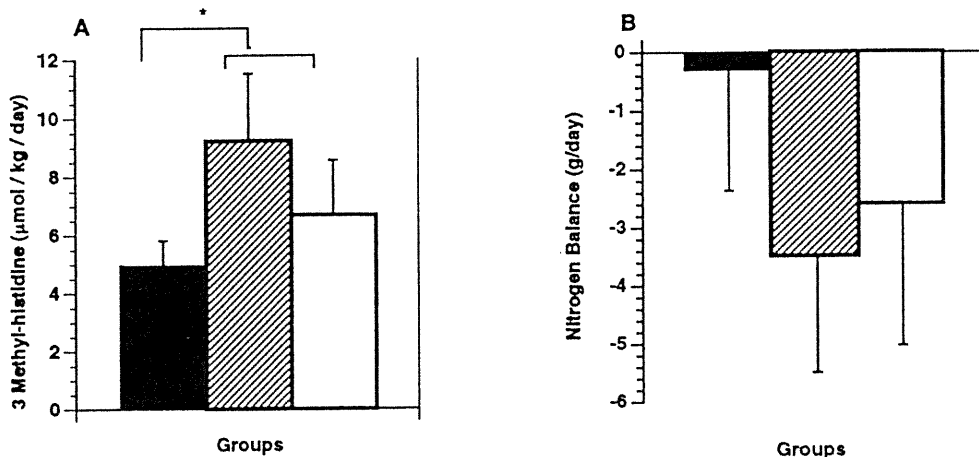
bance was determined with a microtiter plate reader at 595 nm. Wells that exhibited an A595 closest to 50% of the arithmetic mean of the maximal control were considered to represent 50% lysis of L929 cells. Recombinant TNF was used to establish standard curves and to determine TNF concentrations. The lower limit of detection of the TNF assay was 25 pg/mL.

**Statistical Analyses.** Variables measured every 3 days were analyzed by analysis of variance for repeated measures, using a model with five parameters, as follows: a) two parameters for a *priori* comparison of the two low-fat groups (test of the effects of fish oil) and of the low-fat groups against the control group; b) one parameter for time effect; and c) two parameters for the groups times the time interaction. In addition, regression analysis for time series (pooled cross-section regression) (21) was performed on CBG, IL-6,

**Table 2.** Characteristics of the patients (mean  $\pm$  SD)

	Age (yr)	Gender (M/F)	Weight (kg)	Height (cm)	3rd degree % TBSA	TBSA (%)	Inhalation Injury	Pao <sub>2</sub> /Fio <sub>2</sub> <200 (day)	Pneumonia	Length of Care (day) (days/% TBSA)
LF1	40.6 $\pm$ 3.9	8/3	73.4	172 $\pm$ 3	10.7 $\pm$ 3.5	40 $\pm$ 3	5/11	5 $\pm$ 3	1	45 $\pm$ 23 (1.2 $\pm$ 0.4)
LF2	35.2 $\pm$ 2.7	9/3	78.5	173 $\pm$ 3	7.6 $\pm$ 3.0	40 $\pm$ 4	6/12	4 $\pm$ 2	2	46 $\pm$ 23 (1.2 $\pm$ 0.5)
Control	36.3 $\pm$ 3.6	10/2	73.4	173 $\pm$ 3	9.2 $\pm$ 4.0	40 $\pm$ 4	8/12	10 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	7 <sup>b</sup>	67 $\pm$ 28 (1.8 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup> )

TBSA, total body surface area burned; LF1, low fat without  $\omega$ -3 fatty acids; LF2, low fat with  $\omega$ -3 fatty acids.  
<sup>a</sup> $p$  < .01 for controls vs. LF1 + LF1; <sup>b</sup> $p$  < .05 for controls vs. LF1 + LF2.



**Figure 2.** A) Mean 24-hr urinary 3-methylhistidine excretion for the entire period of the study. The normal value for healthy volunteers fed a meat-free diet is 2.5  $\mu$ mol/kg/day. B) Mean nitrogen balance for the entire period of the study (no significant difference between groups). Values for 3-methylhistidine were significantly lower ( $p$  < .05) in the control group (solid bars) than in the low-fat group without fish oil (hatched bars) and the low-fat group with fish oil (open bars). Mean  $\pm$  SEM values.

3-MH, and nitrogen balance, to identify independent predictors for each of these variables. Sepsis score, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation score, amount of insulin received, and urinary cortisol concentration were included in the analysis.

## RESULTS

**Patients.** Forty-three patients were recruited. Six of the patients (three in the control group, two in the LF1 group, and one in the LF2 group) died within 21 days after admission, and data for these six patients were not included in the analyses. Two patients in the control group died after completion of the study, and their data were included in the analyses. Data for two patients were not included in the analyses because of missing values. The characteristics of the 35 patients studied are shown in Table 2. There was no difference in age, weight, height, male-to-female ratio, severity of injury, or incidence of inhalation injury between groups. Respiratory function was assessed daily because all patients were

receiving mechanical ventilation throughout most of the study. The average number of days with an observed Pao<sub>2</sub>/Fio<sub>2</sub> ratio of <200 was higher in control patients than in low fat-fed patients ( $p$  < .01) (Table 2). The number of episodes of pneumonia was seven in the control group, two in the LF1 group, and one in the LF2 group. The difference between the control and low-fat groups was statistically significant ( $p$  < .05, chi-square analysis). Renal and hepatic functions were normal in all patients throughout the study. 3-MH was significantly increased in the low-fat groups for the entire period of the study, and there was no difference in mean nitrogen balance between groups (10) (Fig. 2). A significant ( $p$  < .01) reduction in duration of care in the LF1 and LF2 groups (45 and 46 days, respectively) was observed, compared with the control group (67 days).

**Corticosteroid-Binding Globulin and Cortisol Free Fraction.** Values for CBG, cortisol free fraction, and serum and urinary concentrations of free cortisol are shown in Figure 3. The concentration of CBG was decreased in all patients on day 1; mean values for the

three groups were 40% to 50% of normal (Fig. 3A). The CBG concentration increased over time in all three groups (significant at  $p$  < .01). There was also a significant group effect: values in the control group were lower than in the two low-fat groups throughout the study ( $p$  < .01), but there was no difference between the two low-fat groups. Cortisol free fraction was higher than normal during the first week of the study, with a significant decrease with time ( $p$  < .01; Fig. 3B). Values for cortisol free fraction were higher in the control group than in the two low-fat groups ( $p$  < .01); values in the two low-fat groups did not differ. Free cortisol concentrations were higher in the control group than in the two low-fat groups ( $p$  < .05) throughout the study, and there was no time effect for this variable (Fig. 3C). Urinary cortisol excretion values were higher than the upper limit of normal (145  $\mu$ g/day) (Fig. 3D). Throughout the study, a significant time effect was observed in all groups: cortisol values decreased over time. There was no difference between groups and no interaction between group and time.

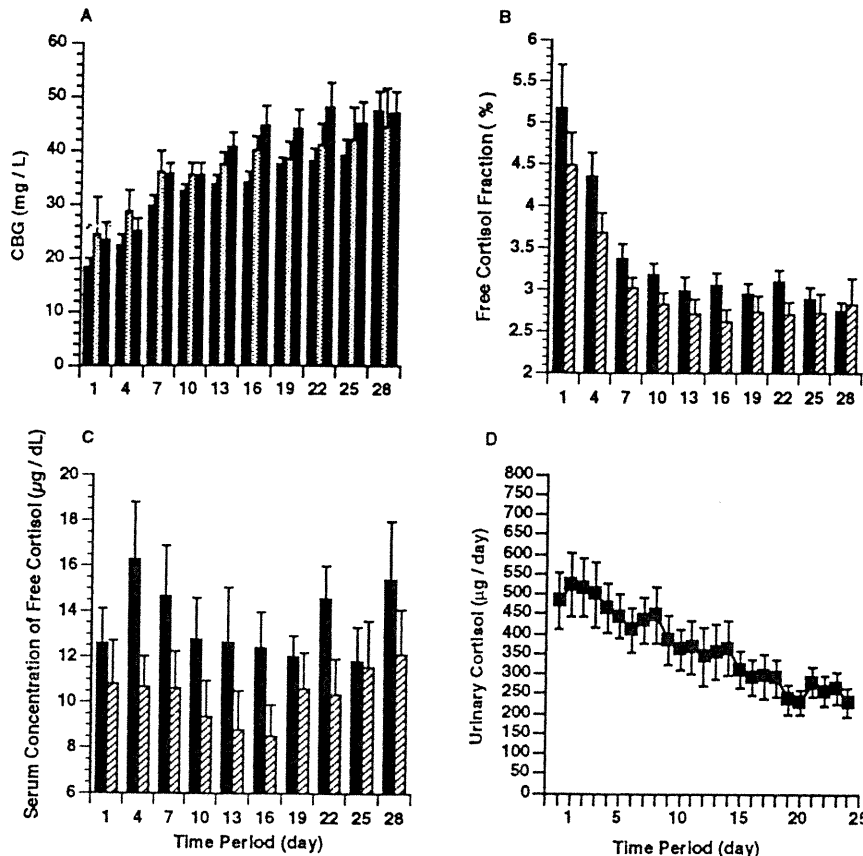


**Interleukin-6.** Serum concentrations of IL-6 were determined every third

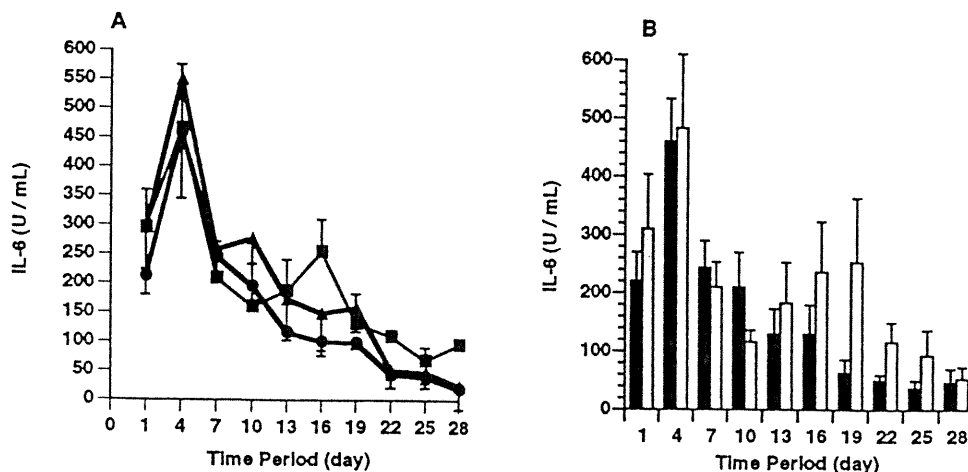
day after the burn injury (Fig. 4A). The majority of samples had detectable

amounts of IL-6, ranging from 16 to 1285 units/mL. The highest mean values were observed on day 4 in all groups. A significant time effect was seen in all groups: IL-6 decreased after day 4. There was no difference between groups for the first 10 days after the burn. However, significant differences between the control group and the two low-fat groups were observed between days 13 and 28 ( $p < .01$ ). No effect of fish oil supplementation was observed. Patients with pneumonia had higher serum concentrations of IL-6 than did patients without pneumonia (Fig. 4B), and pneumonia was always associated with an IL-6 peak (Fig. 5). In addition, when pneumonia was added as a covariant to the analysis of variance for IL-6, the group effect observed during the second part of the study disappeared.

**Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ .** Serum concentrations of TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  were measured by cytolytic assay. Only 11 patients had a detectable serum TNF concentration with this assay. Two patients in each low-fat group had an increase in serum TNF concentration (mean 100 pg/mL), and one patient in each of the low-fat groups had a detectable level only the day after the injury. In the control group, five patients had detectable levels of TNF: three patients when the entire study was taken into account, and two patients during the first week. There was no relationship between serum TNF and IL-6 concentrations or between TNF and the severity of the injury (data not shown).



**Figure 3.** A) Corticosteroid-binding globulin (CBG) (normal range, 35 to 45 mg/L) in the three patient groups. Values for the two low-fat groups (shaded bars) were significantly higher ( $p < .05$ ) than for the control group (solid bars) and did not differ from each other. B) and C) Free cortisol fractions and free cortisol concentrations in the three patient groups. Data from the two low-fat groups were pooled.  $p < .01$  for all comparisons between the control group (solid bars) and the low-fat groups (hatched bars). D) Urinary cortisol (upper limit of normal, 145 µg/day). Data for the three groups were pooled because their difference was not statistically significant. Effect of time for all groups was significant ( $p < .01$ ). Mean  $\pm$  SEM values.



**Figure 4.** Effects of diet on interleukin-6 (IL-6) concentrations. A) Serum IL-6 concentrations throughout the study. Values from days 13 to 28 were significantly higher ( $p < .01$ ) in the control group (squares) than in the two low-fat-intake groups (circles, triangles). B) Serum IL-6 concentrations in patients with and without pneumonia. Data for the three groups were pooled because their difference was not statistically significant. Values from days 13 to 28 were significantly higher ( $p < .01$ ) for the patients with pneumonia (shaded bars) than for the patients without pneumonia (solid bars). Mean  $\pm$  SEM values.

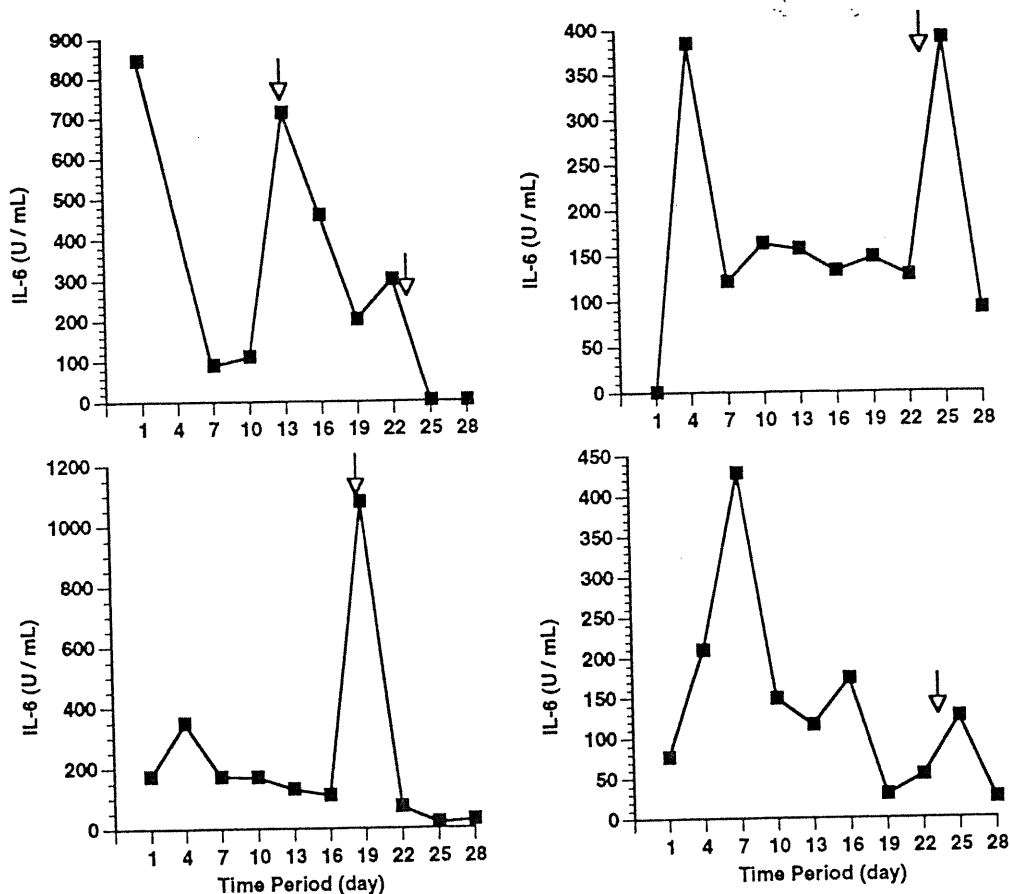


Figure 5. Serum interleukin-6 (IL-6) concentrations in four patients with pneumonia during the study. Arrows indicate the day on which pneumonia was diagnosed. Mean  $\pm$  SEM values.

**Multivariate Analyses: Corticosteroid-Binding Globulin.** Variables with independent correlation with CBG are shown in Figure 6A. Interleukin-6 was the best predictor of CBG, and this relationship was particularly strong when the first five samples of the study were considered. There was an inverse relationship between CBG and IL-6: higher IL-6 values were associated with lower CBG values. The size of the burn area and sepsis score were also independently correlated with CBG. Large burn injuries ( $r = -.16$ ;  $p < .04$ ) and elevated sepsis scores ( $r = -.18$ ;  $p < .05$ ) were associated with lower CBG concentrations. Age was not correlated with CBG. When serum CBG was lower than normal ( $<35$  mg/L), the correlation between CBG and free cortisol fraction was .74 ( $p < .001$ ) (Fig. 6B). In contrast, when serum CBG was within the normal range ( $>35$  mg/L), the correlation between CBG and free cortisol fraction was only .25 ( $p < .05$ ).

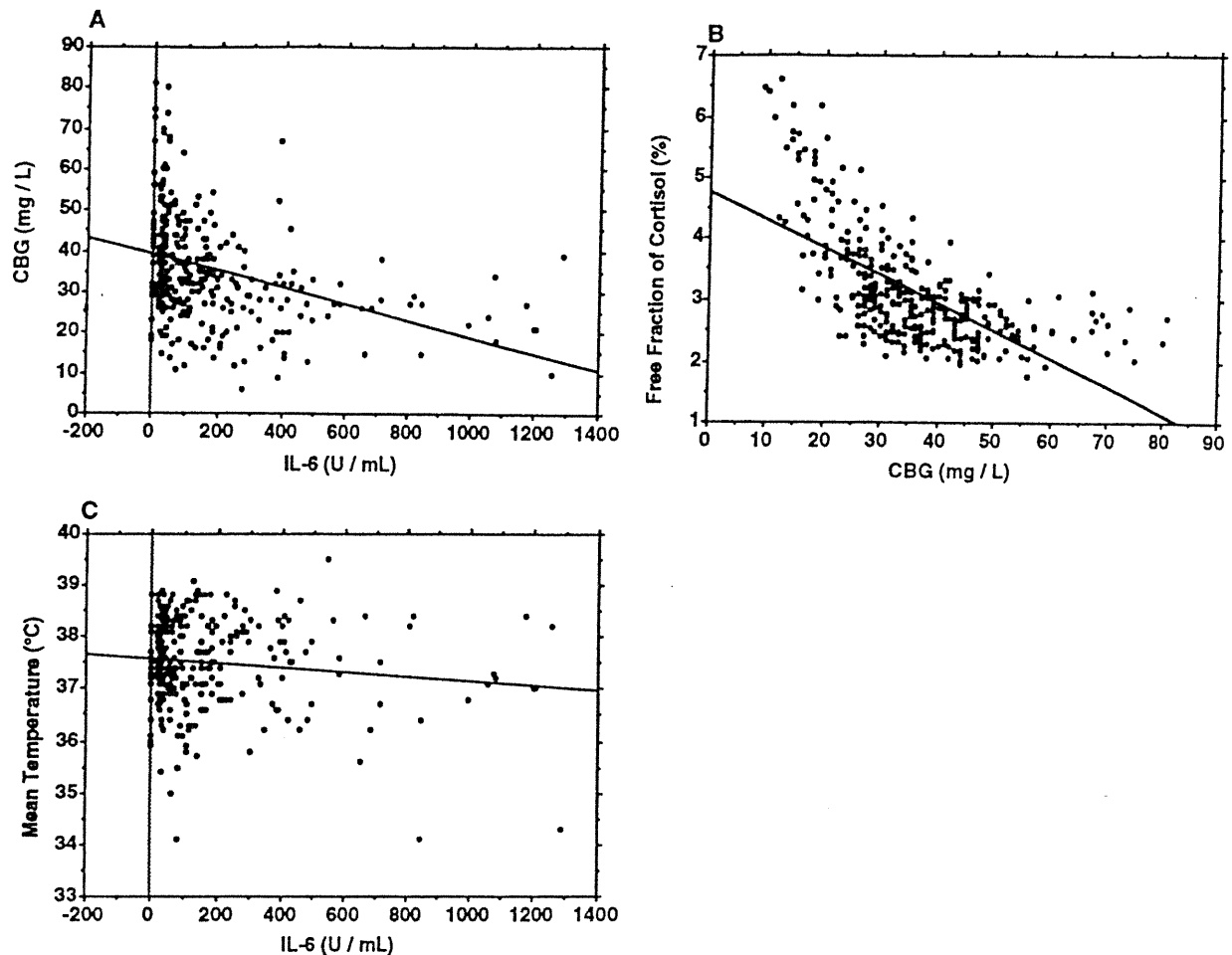
**Interleukin-6.** Serum free cortisol and mean body temperature were the only variables associated with IL-6. The

correlation between IL-6 and mean body temperature was negative ( $r = -.12$ ;  $p < .05$ ; Fig. 6C); the same analysis made with maximum temperature instead of mean temperature gave an identical result. Serum free cortisol was positively correlated with IL-6 ( $r = .22$ ;  $p < .01$ ).

**3-Methylhistidine and Nitrogen Balance.** Variables that were independently correlated with 3-MH were as follows: urinary cortisol ( $r = .25$ ;  $p < .001$ ); feeding group ( $r = .15$ ;  $p < .01$  for LF1 greater than LF2); urinary nitrogen ( $r = .19$ ;  $p < .01$ ); and creatinine clearance ( $r = .26$ ;  $p < .001$ ). There was no relationship between IL-6 and 3-MH ( $r = .07$ ; NS). Nitrogen balance was correlated with feeding group ( $r = .13$ ;  $p < .05$ , for LF2 greater than LF1), sepsis ( $r = -.14$ ;  $p < .05$ ), total body surface area burned ( $r = -.13$ ;  $p < .05$ ), and urinary cortisol ( $r = -.13$ ;  $p < .05$ ), but not with IL-6 ( $r = .02$ ; NS). Thus, in both analyses, the low-fat diet with fish oil was independently associated with better nitrogen retention and lower 3-MH excretion.

## DISCUSSION

Serum IL-6 concentrations are elevated in burn patients. The fluctuation in IL-6 concentration observed in our patients, with a maximum at day 4 and a decrease after the first week, is in agreement with the findings of most studies (4-7), but not all studies (9). Surgery and infection are also associated with high serum concentrations of IL-6 (22-24), and infection in burn patients increases plasma concentrations of the cytokine (5). IL-6 is a pleiotropic cytokine produced by a variety of cells (3), and has important actions on inflammation, hematopoiesis, and the immune system. Its release into the circulation occurs within a few hours after injury, and the elevated IL-6 concentrations in our patients on day 1 confirm that IL-6 production is an early event after burn injury (8). An important finding is the lack of difference in serum IL-6 concentration during the first 14 days between patients fed low-fat solutions and control patients. Feeding low fat,  $\omega$ -3 fatty acid-



**Figure 6.** A) Correlation between corticosteroid-binding globulin (CBG) and interleukin-6 (IL-6) concentration. IL-6 was the best predictor of CBG. The relationship between CBG and IL-6 was negative ( $r = -.367$ ;  $p < .0001$ ) and was independent of the relationship between IL-6, total body surface area, and sepsis. B) Correlation between CBG and free fraction of cortisol ( $r = -.646$ ). When the serum CBG concentration was lower than normal ( $<35$  mg/L), the correlation between CBG and free cortisol was  $-.74$  ( $p < .01$ ). When the serum CBG concentration was within the normal range ( $>35$  mg/L), the correlation was  $-.25$  ( $p < .05$ ). C) Correlation between IL-6 and mean body temperature ( $r = -.12$ ;  $p < .05$ ).

enriched diets after burn injury has been associated with decreased inflammation and improved immune function in guinea pigs (25), and since fewer of our patients fed low-fat solutions had pneumonia than control patients did (10), it was expected that they would have lower concentrations of IL-6. Very high concentrations of IL-6, such as observed in our patients during the first week after burn injury, impair immune functions (11). That no difference was observed with low-fat feeding suggests that: a) more frequent sampling is necessary to detect a difference; or b) low-fat, nutritional support improves immune function without affecting the inflammatory response to burn injury. We favor the second hypothesis because multivariate analysis of IL-6 predictors did not show a significant relationship between

IL-6 and lipids in the diet. Furthermore, there was no difference between mean values in the three feeding groups. There was, however, a difference between values in control patients and patients fed low-fat solutions during the second part of the study (days 13 to 28): control patients had higher IL-6 concentrations. Higher concentrations of IL-6 in the control group may be related to the effect of the low fat diet. However, it can be proposed that higher concentrations of IL-6 in control patients may be due to the higher number of infectious episodes observed in the control group. Comparison of serum IL-6 concentrations in our patients with or without pneumonia showed that pneumonia was associated with increased IL-6 concentrations, irrespective of the diet received (Fig. 4B). In addition, when pneumonia was con-

sidered as a covariant in the analysis of IL-6 variance, the effect of diet was no longer observed, which suggests that high IL-6 concentrations in the control group were the result of pneumonia. This finding is in agreement with studies in which elevated serum IL-6 concentrations were related to infection in burn patients (5).

TNF concentration data show that this cytokine is elevated in only some patients, without a clear relationship to the severity of injury. Previous reports of burn patients (4, 5) have found elevated serum TNF concentrations only in patients with infection. In our study, serum bioactive TNF was found inconsistently in severely burned patients and was not related to IL-6 concentrations.

An original finding of this study is the relationship between IL-6, CBG,

and cortisol free fraction. CBG is the main carrier of cortisol in plasma, and, although its concentration in plasma shows little physiologic variation, it is decreased during inflammation, burn injury, and sepsis (26–30). Burn injury induces a 50% decrease in serum CBG within 24 hrs after burn, and that burn size can predict the magnitude of this phenomenon. As a consequence of this decrease in CBG, the free fraction of circulating cortisol increases (Fig. 2). This increase in circulating cortisol, together with the increase in cortisol secretion through the activation of the corticotropic axis, results in a marked augmentation of the amount of cortisol available to the tissues. The amount of free cortisol excreted during the first 2 wks after injury was three times the upper limit of normal. The importance of the variations in CBG concentrations for the amount of cortisol available to the tissue is illustrated by the fact that when CBG levels were lower than normal, CBG concentration accounted for almost half the variance of serum free cortisol. This relationship was much weaker when CBG levels returned to normal values (Fig. 3). From these observations, it can be proposed that the decrease in serum CBG concentration in the hours following burn injury plays a major role in those biological systems that are sensitive to glucocorticoids, such as the immune system, muscle protein metabolism, and wound healing.

The decrease in CBG in burn patients should not result in an increase in free cortisol if the negative feedback on adrenocorticotropin secretion is normal. Since this negative feedback is impaired in patients with sepsis during dexamethasone infusion (18), such impairment can be hypothesized in our patients.

The mechanism for the decrease in CBG following inflammation, sepsis, or burn injury is not known. Under these circumstances, CBG behaves as a “negative” acute-phase protein (30), and inflammatory cytokines are candidates for mediators of the suppression of CBG production. IL-6 may be responsible, at least in part, for the decrease in CBG, for the following reasons: a) IL-6 is produced very early after the stressful event and during inflammation and sepsis; b) IL-6 inhibition of the production of CBG by human hepatoma-G2 cells *in vitro* is dose

dependent (13); and c) IL-6 is the best predictor of CBG concentration in our group of burn patients. This study provides the first evidence that IL-6 decreases serum CBG concentration after burn injury. Therefore, additional investigation will be necessary to support our hypothesis. The fact that low-fat feeding induced a more rapid recovery in serum CBG concentrations without changing IL-6 concentrations suggests either a very early response of IL-6 production to low-fat feeding that was missed in our study, or the existence of several mediators between inflammation and CBG production.

The consequences of increased serum IL-6 on protein metabolism are of interest because transgenic mice that overexpress IL-6 show muscle atrophy (16) and IL-6 administration in rats increased muscle protein breakdown (15). In our patients, there was no relationship between serum IL-6 and nitrogen balance or 3-MH excretion, which suggests that IL-6 does not directly affect whole body protein metabolism. We cannot rule out an effect of IL-6 on muscle protein metabolism, however, since the origin of 3-MH in burn patients may not be predominantly skeletal muscle but tissues with rapid turnover of actomyosins, such as gut or skin. Our data support the hypothesis of an indirect effect of IL-6 on protein metabolism through the increase in free cortisol induced by low CBG concentrations. Urinary cortisol was significantly correlated with both nitrogen balance and 3-MH excretion, and high concentrations of IL-6 were associated with low serum CBG concentrations. In support of this hypothesis, Goodman (15) showed no increase in muscle protein breakdown with the addition of IL-6 to the rat muscle incubation milieu, but showed increased muscle protein breakdown with IL-6 administration to the animal before incubating the muscles.

Although some serum samples from patients had detectable concentrations of TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  with cytotoxic activity against L929 cells, most of these samples gave negative results. Increased concentrations of TNF after burn injury are well documented (4, 5), and the discrepancy with our results can be related to the sensitivity of the assay. In several studies, immunoassays were used to determine the presence of TNF. However, immunoassays

**I**nterleukin-6 production is a constant and early event in severe burns and may be a major factor in the early decrease of circulating corticosteroid-binding globulin.

estimate only immunoreactive TNF and give no information on the biological activity of secreted molecules (4, 5). Thus, we cannot exclude the presence of TNF, but the role of other inhibitory molecules on TNF activity or the presence of an inactive form of TNF in serum remain to be determined. Comparative studies using both immunologic and biological assays will be necessary to determine the role of TNF.

In conclusion, IL-6 production is a constant and early event in severe burns and may be a major factor in the early decrease of circulating CBG. This decrease in circulating CBG has important consequences on the amount of cortisol available to the tissues in the days after injury and, thus, may influence protein metabolism, the immune system, and wound repair. However, the decreased incidence of pneumonia and the faster recovery of the patients fed a low-fat diet, with or without fish oil, were not related to lower IL-6 concentrations.

## REFERENCES

1. Baumann H, Gauldie J: The acute phase response. *Immunol Today* 1994; 15:74–80
2. Lowry SF: Cytokine mediators of immunity and inflammation. *Arch Surg* 1993; 128:1235–1241
3. Akira S, Taga T, Kishimoto T: Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 1993; 54:1–78
4. De Bandt JP, Chollet-Martin S, Hervann A, et al: Cytokine response to burn injury: Relationship with protein metabolism. *J Trauma* 1994; 36:624–628
5. Drost AC, Bursleson DG, Cioffi WG, et al: Plasma cytokines after thermal injury and their relationship to infection. *Ann Surg* 1993; 218:74–78
6. Kowal-Vern A, Walengra J, Hoppensteadt D, et al: Interleukin-2

- and interleukin-6 in relation to burn wound size in the acute phase of thermal injury. *J Am Coll Surg* 1994; 178:357-362
7. Meek M, Munster AM, Winchurch RA, et al: The Baltimore sepsis scale: Measurement of sepsis in patients with burns using a new scoring system. *J Burn Care Rehabil* 1991; 12:564-568
  8. Nijsten MW, Hack CE, Helle H, et al: Interleukin-6 and its relation to the humoral immune response and clinical parameters in burned patients. *Surgery* 1991; 109:761-767
  9. Struzyna J, Pojda Z, Braun B, et al: Serum cytokine levels (IL-4, IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF) in burn patients. *Burn* 1995; 21:437-440
  10. Garrel DR, Razi M, Larivière F, et al: Improved clinical status and length of care with low-fat nutrition support in burn patients. *JPEN* 1995; 19: 482-491
  11. Zhou DH, Munster AM, Winchurch RA: Inhibitory effects of interleukin 6 on immunity. *Arch Surg* 1992; 127:65-68
  12. Afford SC, Pongracz J, Stockley RA, et al: The induction by human interleukin-6 of apoptosis in the promonocytic cell line U937 and human neutrophils. *J Biol Chem* 1992; 267: 21612-21616
  13. Bartalena L, Hammond GL, Farsettin A, et al: Interleukin-6 inhibits corticosteroid-binding globulin synthesis by human hepatoblastoma-derived (Hep G2) cells. *Endocrinology* 1993; 133: 291-296
  14. Paavonen T: Hormonal regulation of immune response. *Ann Med* 1994; 26:255-258
  15. Goodman MN: Interleukin-6 induces skeletal muscle protein breakdown in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994; 205:182-185
  16. Tsujinaka T, Ebisui C, Fujita J, et al: Muscle undergoes atrophy in association with increase of lysosomal cathepsin activity in interleukin-6 transgenic mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 207:168-174
  17. Garrel DR, De Jonge L: Thermogenic response to feeding in severely burned patients: Relation to resting metabolic rate. *Burn* 1993; 19:467-472
  18. Perrot D, Bonneton A, Dechaud H, et al: Hypercortisolism in septic shock is not suppressible by dexamethasone infusion. *Crit Care Med* 1993; 21: 396-401
  19. Pugeat MM, Chrousos GP, Nisula BC, et al: Plasma cortisol transport and primate evolution. *Endocrinology* 1984; 115:357-361
  20. Van Snick J, Cayphas S, Vink A, et al: Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of a new T cell-derived lymphokine with growth factor activity for B cell hybridomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:9679-9683
  21. Judge GG, Griffiths WE, Hill RC, et al: The Theory and Practice of Econometrics. Second Edition. New York, Wiley, 1985, pp 375-380
  22. Svoboda P, Kantorova I, Ochmann J: Dynamics of interleukin 1, 2, and 6 and tumor necrosis factor alpha in multiple trauma patients. *J Trauma* 1994; 36:336-340
  23. Dofferhoff AM, Bom VJJ, de Vries HSP: Patterns of cytokines, plasma endotoxin, plasminogen activator inhibitor, and acute-phase protein during the treatment of severe sepsis in humans. *Crit Care Med* 1992; 20:185-192
  24. Roumen RM, Hendriks T, van der Ven-Jongerkrijg J, et al: Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock and severe blunt trauma. *Ann Surg* 1993; 218: 769-776
  25. Kinsella JE, Lokesh B: Dietary lipids, eicosanoids, and the immune system. *Crit Care Med* 1993; 18(Suppl):S94-S113
  26. Garrel DR: Corticosteroid-binding globulin during inflammation and burn injury: Nutritional modulation and clinical implications. *Horm Res* 1996; 45:245-251
  27. Garrel DR, Zhang L, Zhao XF, et al: Effect of burn injury on corticosteroid levels in plasma and wound fluid. *Wound Repair and Regeneration* 1993; 1:10-14
  28. Savu L, Zouaghi H, Carli H, et al: Serum depletion of corticosteroid-binding activities, an early marker of septic shock. *Biochem Biophys Res Commun* 1981; 102:411-419
  29. Pugeat M, Bonneton A, Perrot D, et al: Decreased immunoreactivity and binding capacity of corticosteroid-binding globulin in serum in septic shock. *Clin Chem* 1989; 35:1675-1679
  30. Savu L, Lombart C, Nunez EA: Corticosterone-binding globulin: An acute phase "negative" protein in the rat. *FEBS Lett* 1980; 113:102-106

# Decreased serum insulin-like growth factor-I in burn patients: Relationship with serum insulin-like growth factor binding protein-3 proteolysis and the influence of lipid composition in nutritional support

Thierry Abrisbat, PhD; Bernadette Nedelec, PhD; Nathalie Jobin, MSc; Dominique R. Garrel, MD

**Objectives:** To test the effects of the amount and type of fat in the nutritional support on serum insulin-like growth factor (IGF)-I concentrations in burn patients and to test the hypothesis that the serum proteolytic activity for insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 is a major mechanism for the decreased serum IGF-I observed in these patients.

**Design:** Randomized, double-blind trial of three different nutritional supports and analysis of serum IGF-I, IGFBP-3, and serum IGFBP-3 proteolysis.

**Setting:** Burn center in a university hospital.

**Patients:** A total of 23 severely burned (>25% total body surface area burned) adult patients.

**Interventions:** Patients were randomly assigned to three types of nutritional support differing in the amount of energy derived from fat and the presence or absence of fish oil: Group I (control), 35% fat; Group II, 15% fat; Group III, 15% fat with 50% as fish oil. Nutritional support was both parenteral and enteral and was started within 24 hrs of admission.

**Measurements and Main Results:** Serum IGF-I and IGFBP-3 were measured by radioimmunoassay every 3 days for 28 days in 23 severely burned adults. In six patients, IGFBP-3 was measured by ligand binding assay and the serum proteolytic activity for rhIGFBP-3 was measured as well. Serum IGF-I concentration was low in all subjects throughout the study period, but did increase with time ( $p < .01$ ); significantly higher values were found in

Group III ( $p < .05$ ). Multivariate analysis showed that fish oil and low fat solutions were significantly correlated to serum IGF-I concentrations. Serum IGFBP-3 (radioimmunoassay) was higher than normal throughout the study with no difference between the groups. Between days 4 and 16, IGFBP-3 was cleaved into two fragments in all patients studied, and the molecular weights of the fragments were equal to those observed in the serum of a woman late in pregnancy. During this period of time, serum proteolytic activity for rhIGFBP-3 was >30% in 24 of the 30 samples measured, whereas 20 of the 28 samples measured thereafter were normal (<25%). Serum IGFBP-3 concentration from ligand binding assay was correlated with serum proteolytic capacity in all subjects (mean  $r^2 = 0.77$ ;  $p < .01$ ) and with serum IGF-I concentrations in five of six subjects (mean  $r^2 = 0.81$ ;  $p < .01$ ).

**Conclusions:** In burn injury, serum IGF-I concentrations are sensitive to the amount and type of fat in their nutritional support. The presence of fish oil allowed for a more rapid recovery of serum IGF-I levels. The proteolysis of IGFBP-3 may be an important cause of the decreased serum IGF-I values and the protease(s) responsible for this seem to be similar to those observed in late pregnancy. (Crit Care Med 2000; 28:2366-2372)

**KEY WORDS:** insulin-like growth factor-I; insulin-like growth factor binding proteins; burn injury; nutrition; lipids

The concentration of serum insulin-like growth factor (IGF)-I is decreased in patients with severe burns (1, 2), but the mechanism responsible for this observation remains to be identified. Insulin-like

growth factors circulate in the blood bound to specific binding proteins, and of the seven insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) so far identified in humans, the one that is most important for the maintenance of IGF-I in the circulation is IGFBP-3 (3). The binding of IGF-I to IGFBP-3 and its associated acid-labile subunit prevents the rapid degradation of the peptide by plasma proteases (4). A decrease in circulating IGF-I levels could therefore be caused by diminished production of the peptide or of its carrier, or from an increased amount of degradation because of a decreased affinity of IGFBP-3 for IGF-I. Such a decrease in affinity has been found after proteolytic

cleavage of the binding protein in late pregnancy (5, 6) and in various pathological conditions such as critical illness (7), elective surgery (8), trauma (9, 10), and acquired immunodeficiency syndrome (11). The primary aim of this study was therefore to measure IGFBP-3 concentrations and the proteolytic degradation of this protein in severely burned individuals.

In healthy individuals, serum IGF-I is a sensitive marker of energy and protein intake. A 70% decrease in serum IGF-I has been found after a 5-day fast, and recovery to normal levels required adequate provision of both energy and proteins (12). Furthermore, in malnourished

From the Burn Centre, Hotel-Dieu Hospital (Drs. Garrel and Nedelec and Ms. Jobin), and Neuroendocrinology Laboratory, Notre-Dame Hospital (Dr. Abrisbat) Montréal, Québec, Canada.

Supported, in part, by Fonds de la Recherche en Santé du Québec, National Health Research and Development Program Grant #6605-361.

Address requests for reprints to: Dominique Garrel, MD, Clinical Research Centre, Hotel-Dieu Hospital, 3840 St. Urbain, Montreal, PQ, CANADA H2W 1T8.

Copyright © 2000 by Lippincott Williams & Wilkins

subjects receiving enteral and parenteral support, serum IGF-I increased three-fold after 10 days, and the increase was correlated with the change in nitrogen balance (13). These results suggested that IGF-I might be a marker of nutritional status in critically ill patients. Comparisons of nitrogen balance and serum IGF-I in this patient population have yielded inconsistent results (1, 14, 15), and there are no data in the literature addressing the issue of the relationship between serum IGF-I and energy and protein intake under extreme stress. The second aim of this study was therefore to analyze this relationship in severely burned individuals.

Finally, low fat feeding and  $\omega$ -3 fatty acids have been found beneficial in burned guinea pigs, reducing protein catabolism and improving immune functions (16, 17) and we have found that low fat nutritional support decreases the incidence of infection and shortens the length of care in burned patients (18). The third aim of this study was therefore to compare serum IGF-I and IGFBP-3 in adult patients fed different amounts of fat, with or without fish oil.

## MATERIALS AND METHODS

**Patients.** Patients were adults with thermal burn injuries exceeding 25% of their total body surface area and without preexisting medical conditions such as diabetes, obesity, or cardiovascular disease. They were admitted to the Burn Center within hours after injury and randomly allocated to one of three types of nutritional support. Group I (control) received fat as 35% of energy intake; carbohydrate, 40%; and protein, 25%. Group II received fat, 15%; carbohydrate, 60%; protein, 25%. Group III received fat, 15% with 50% as fish oil; carbohydrate, 60%; protein, 25%. All patients were admitted to the burn center within 24 hrs postinjury. The Parkland formula with lactated Ringer's solution was used for resuscitation. With the exception of the hands, burn wounds were left without dressing and without antiseptic ointment. The existence of bronchial injury was assessed by bronchoscopy, which was performed in all patients within 3 days of admission. Pain was managed using intravenous morphine. Informed consent was obtained from each patient or from his/her closest relative and the protocol was approved by the human research committee of our institution.

**Nutritional Support.** Nutritional support was started within 24 hrs of admission through a nasogastric tube inserted under gastroscopic guidance. Enteral solutions were made for the study by Mead Johnson and differed only in the % contribution from fat and

carbohydrate. In group III, fish oil in the enteral solution was derived from menhaden oil. Parenteral nutrition was used as well, as the energy requirements of the patients were not met by enteral feeding. Parenteral solutions were given through a central venous catheter and consisted of an admixture of amino acids (vamin 6.5%), dextrose (18%), and intralipid (10%). The energy composition of the parenteral solutions was identical to that of the enteral solution. Because  $\omega$ -3 fatty acids for intravenous administration are not available in Canada, we used fish oil (MaxEPA, Sherer, Troy, MI) as an enteral supplement when  $\omega$ -3 fatty acids had to be given in excess of the amount administered with the enteral solution. Energy requirements of the patients were determined with the Curreri formula (19) and assessed twice a week with indirect calorimetry (Delatrac monitor) as previously described (20). Protein intake was determined as 25% of total energy intake. Average energy and protein intake for the three groups were 2680 kcal/day and 159 g/day.

**Blood and Urine Sampling.** Venous blood was obtained between 0700 and 0900 hrs every 3 days for 28 days, centrifuged, aliquoted, and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Day 1 was defined as the morning after admission. Urine collection were obtained daily and urine volumes calculated from weight and density.

**Biochemistry.** Urinary nitrogen was measured daily with an Antek analyzer (Antek, Houston, TX). Nitrogen balance was calculated daily as nitrogen intake from enteral and parenteral solutions minus urinary nitrogen excretion. Urinary 3-methylhistidine excretion was measured daily by reverse phase high-performance liquid chromatography (Hewlett-Packard 1090, Mississauga, ON, Canada) after derivatization with orthophthalaldehyde and mercaptopionic acid and detection with fluorometry.

**Serum IGF-I and IGFBP-3 Concentrations.** Serum IGF-I was measured by radioimmunoassay as previously described (21). Briefly, IGF-I was extracted using a formic acid-acetone procedure and the radioimmunoassay was carried out under equilibrium conditions with recombinant human IGF-I for radioiodination and standards and anti-hIGF-I antibody. Radioiodination of rhIGF-I was performed by a conventional chloramine T method.

IGFBP-3 was measured by radioimmunoassay using *Escherichia coli* rhIGFBP-3, kindly provided by Dr. C. Maack (Biogrowth, CA) and an anti-IGFBP-3 polyclonal antibody made in our laboratory. In addition, IGFBP-3 concentration was measured from the western-ligand blotting with IGF-1, in six patients.

**Western Ligand Blotting for IGFBP-3.** These measurements were made in six patients as an exploratory study. Two patients from each dietary group were chosen. All reagents and materials were purchased from Biorad Laboratories (Richmond, CA) except when otherwise specified. Western ligand blot-

ting was performed according to Hossenloop et al. (22) and described elsewhere (23). Briefly, the samples were dissolved in 4 volumes of nonreducing sample buffer (2% w/v sodium dodecyl sulfate, Tris-HCl 60 mmol/L, 10% glycerol, 0.00125% bromophenol blue, pH 6.8) and heated 5 mins at  $100^{\circ}\text{C}$ , then loaded onto discontinuous polyacrylamide gels and run at 150 V. The gels were then equilibrated in prechilled transfer buffer and proteins were transferred onto nitrocellulose membranes. For western ligand blotting, the membranes were sequentially washed on a rocking platform in Tris-buffered saline solution, 30 mins in 3% Nonidet P-40 (Sigma Chemical, St-Louis, MO), 2 hrs in 1% bovine serum albumin (RIA grade, Sigma), 10 mins in 0.1% Tween-20, and subsequently incubated individually with 20 mL of TBS containing Tween-20 in air-tight bags at  $4^{\circ}\text{C}$  for 15 hrs. The membranes were washed, air dried, and IGFBP-3 were localized by autoradiography with Kodak X-Omat AR film (Eastman Kodak, Rochester, NY) with intensifying screens (Picker Spectra L-Plus) at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 48 hrs. Bands were cut from the nitrocellulose membranes with the use of the autoradiograms as a guide and evaluated with a gamma counter (micromedic 4/600 plus).

**IGFBP-3 Proteolysis Assay.** Measurement of IGFBP-degrading activity of sera was performed according to Lamson et al. (24).  $^{125}\text{I}$ -IGFBP-3 (4500 cpm in 17 mL PBS containing  $\text{CaCl}_2$  0.05mmol/L) was incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  with 3 mL of the test sample for 4 hrs. The reaction was stopped by adding electrophoresis sample buffer in a 1:4 dilution. Samples were boiled at  $100^{\circ}\text{C}$  for 5 mins then immediately subjected to a sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis under non-reducing conditions; gels were dried for 90 mins and autoradiographed. Bands on the gel corresponding to bands on the autoradiograms were cut and counted for radioactivity. The IGFBP-3 proteolytic activity was estimated as the sum of the proteolytic fragment radioactivity divided by the total radioactivity in each lane. The IGFBP-3 degradative activity of normal serum in our assay was 25%.

**Calculations and Statistics.** The data were analyzed with analysis of variance for repeated measurements, with time and diet as dependent variables. Relationship between variables was analyzed with pooled cross section time-series analysis.

## RESULTS

**Patients.** Characteristics of the patients are shown in Table 1; there were no differences among groups with respect to age, weight, or male/female ratio. Severity of injury, as assessed by percentage of total body surface area burned and by the presence or absence of bronchial injury, did not differ between groups.

Table 1. Characteristics of the patients

	n	Age (yrs)	Weight (kg)	Height (m)	TBSA (%)	Lung Injury (n)	Gender (M/F)
Group I	8	38 ± 10	74 ± 13	1.75 ± 0.9	39 ± 12	3	5/3
Group II	8	34 ± 8	80 ± 12	1.74 ± 1.1	43 ± 15	4	6/2
Group III	7	30 ± 10	68 ± 12	1.73 ± 0.8	37 ± 10	3	5/2

TBSA, total body surface area burned; Group I, control group; Group II, low fat without fish oil; Group III, low fat with fish oil.

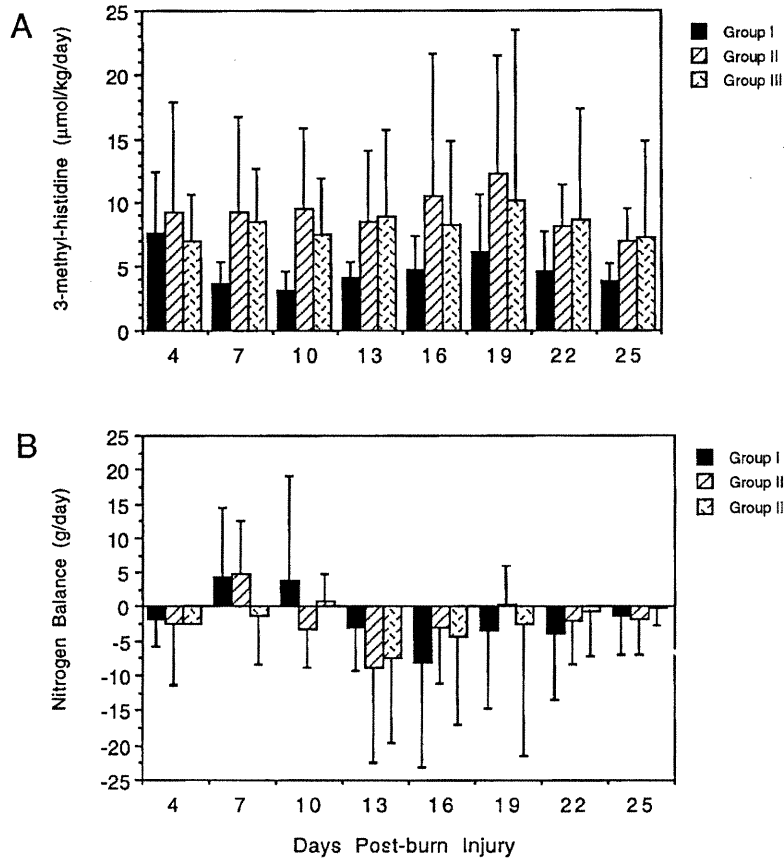


Figure 1. Urinary 3 methyl-histidine excretion and nitrogen balance. *Top*, the average levels of 3 methyl-histidine evaluated over 3-day periods for group I (solid bars), group II (bars with diagonal lines) and group III (hatched bars). *Bottom*, the average nitrogen balance measured over 3-day periods for each group. No relationship exists between these two variables and serum insulin-like growth factor-I (Fig. 2) when multivariate analysis was performed.

**Nitrogen Balance and Urinary 3 Methyl-Histidine Excretion.** Multivariate analysis of 3 methyl-histidine (Fig. 1, *top*) and nitrogen balance (Fig. 1, *bottom*) showed no relationship between these two variables and serum IGF-I (Fig. 2, *bottom*).

**Serum IGF-I and IGFBP-3 Concentrations.** Serum IGF-I was markedly lower than normal throughout the study, with values increasing significantly with time (Fig. 2, *bottom*). Patients who had received fish oil had significantly higher

IGF-I levels than the two other groups and the difference increased with time. There was no difference between the control group and the group fed low fat solutions without fish oil. Normal values for serum IGF-I in an age matched group of healthy individuals in our laboratory was  $240 \pm 52$  mg/L. Serum IGFBP-3 showed a significant increase with time, with no difference between groups (Fig. 2, *top*). Mean values for IGFBP-3 were above normal throughout the study. Normal values obtained from Pooled cross

section analysis of the variance of IGF-I showed that both low fat feeding and fish oil were significantly and independently related to IGF-I (Table 2). Energy and protein intake were not related to serum IGF-I concentration.

**Ligand Blotting of IGFBPs.** In all six patients studied, IGFBP-3 appeared as a cluster of bands between 45,000 and 39,000 mol wt. During the first 2 wks of the study, these bands were barely detectable and two main bands of 31,000 and 21,000 mol wt were visible. A representative example of one patient is shown in Figure 3.

**Serum Proteolytic Activity for IGFBP-3.** *In vitro* degradation of IGFBP-3 was significant in most samples studied, particularly during the first 2 wks of the study. The cumulative results for the 6 patients are shown in Figure 4. The autoradiogram of one representative patient (this patient belonged to the control group) is shown in Figure 5. The two fragments observed after incubation with the patient's serum have the same molecular weight as those observed after incubation of IGFBP-3 with the serum of a late pregnant woman, ie, 23 and 16 kilodaltons.

Inverse correlations between serum proteolytic activity and serum IGF-I and IGFBP-3 concentrations were significant for each subject. In every subject, serum proteolytic activity was strongly and inversely correlated with IGFBP-3 concentrations measured by ligand blotting (mean  $r^2 = 0.77$ ; range, 0.59 to 0.94;  $p < .01$ ). Inverse correlations between serum proteolytic activity and IGF-I measured by radioimmunoassay were also significant (mean  $r^2 = 0.30$ ; range, 0.17 to 0.46;  $p < .05$ ). A similar relationship was found with IGF-I concentrations in five of six subjects ( $r^2$  range, 0.44 to 0.88;  $p < .01$ ). In Figure 6, the relationship between IGFBP-3 concentrations and serum proteolytic activity in the six subjects is shown. When proteolytic activity reached 30%, a dramatic decrease in IGFBP-3 concentrations was seen. As the sera of only two patients per group were assayed, statistical analysis of intergroup differences were not made. Average values for the three groups were similar, however: 55%, 41% and 39% for groups I, II, and III, respectively.

## DISCUSSION

One of the novel findings of this study is the relationship between nutritional support and circulating IGF-I levels in



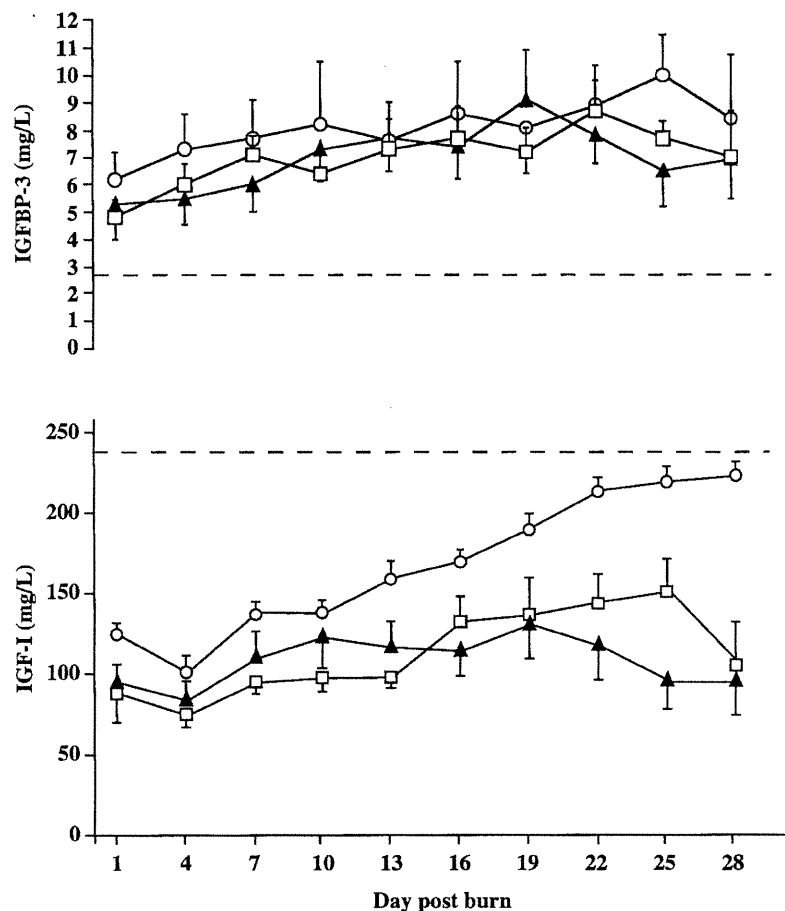


Figure 2. Serum insulin-like growth factor binding protein-3 (*IGFBP-3*) (top) and insulin-like growth factor-I (*IGF-I*) concentrations (bottom) of the patients throughout the study. Serum insulin-like growth factor binding protein-3 values are mean  $\pm$  SD of values from all patients, measured by radioimmunoassay. There were no differences among the three groups for insulin-like growth factor binding protein-3 (normal value,  $2.7 \pm 0.4$  mg/L;  $n = 162$ ). Serum insulin-like growth factor-I: Group III > Groups I + II (Table 2). Values are mean  $\pm$  SEM (normal value,  $240 \pm 52$  mg/L). Group I (triangles), control group; group II (squares), patients with low fat nutritional support without fish oil; group III (circles), patients with low fat nutritional support and fish oil.

Table 2. Multivariate analysis of insulin-like growth factor-I variance ( $n = 189$ )

Variable	Correlation Coefficient	<i>p</i>
TBSA	0.09	NS
Group I vs. group II	0.32	<.01
Groups I and II vs. group III	0.27	<.01
Age	-0.09	NS
Caloric intake	0.11	NS
Protein intake	-0.02	NS

TBSA, total body surface area burned; NS, not significant.

Receiving fish oil and/or low fat nutritional support were both associated with higher insulin-like growth factor-I concentrations.

severely burned patients. In healthy individuals, serum IGF-I is responsive to protein and energy intake, with a rapid decrease during starvation or semistarvation, and a return toward normal concentration during refeeding (25). Because serum IGF-I concentration is closely cor-

related to acute changes in nitrogen balance in healthy volunteers during starvation and refeeding, it has been postulated that serum IGF-I may be used as a marker of nutritional status in critically ill patients (26, 27). However several studies, including our own, have failed to

demonstrate a relationship between nitrogen balance and serum IGF-I in severely ill individuals (1, 14). In the present work, in addition to nitrogen balance, we analyzed the statistical relationship between serum IGF-I and protein and energy intake with a model for pooled data that took 230 values into account. The lack of relationship between IGF-I and energy and protein intake suggests that the mechanisms responsible for the change in serum IGF-I during starvation and refeeding are not operating in burned patients. In contrast, it was found that patients fed fish oil had higher IGF-I concentrations during the second part of the study, the third and fourth weeks postinjury. The results of the multivariate analysis confirmed the relationship between fish oil and serum IGF-I and showed that low fat feeding was also independently associated with higher IGF-I concentrations. It is therefore likely that both low fat regimens and the addition of fish oil increased the concentration of serum IGF-I in our patients. The mechanism of this effect remains to be studied. One of the consequences of both low fat feeding and fish oil administration is to decrease the production of eicosanoids derived from the metabolism of arachidonic acid through the cyclooxygenase pathway (28). One of these eicosanoids, prostaglandin E<sub>2</sub>, is an important mediator of the inflammatory response and has immunosuppressive effects (29). Whether these biochemical consequences of low fat feeding and fish oil are related to our results is not yet known.

The second important finding of this study is evidence of an intense proteolytic degradation of IGFBP-3, the main IGF-I carrier in human blood, during the first 2 wks postinjury. Proteolytic degradation of circulating IGFBP-3 was first shown to be increased in late pregnancy (5, 6) and subsequently in critically ill patients (7, 8), patients undergoing elective cholecystectomy (30), and trauma patients (10). Our data suggest that a common mechanism is underlying all these conditions, as the molecular weights of IGFBP-3 fragments in our patient's sera are similar to those previously published (between 31,000 and 26,000 kilodaltons). The proteolytic fragments of IGFBP-3 have markedly reduced affinity for IGF-I (6, 31) and this may explain the low concentration of this growth factor during the first 2 wks postinjury. Support of this hypothesis is provided by the strong and inverse relationship between IGF-I concen-

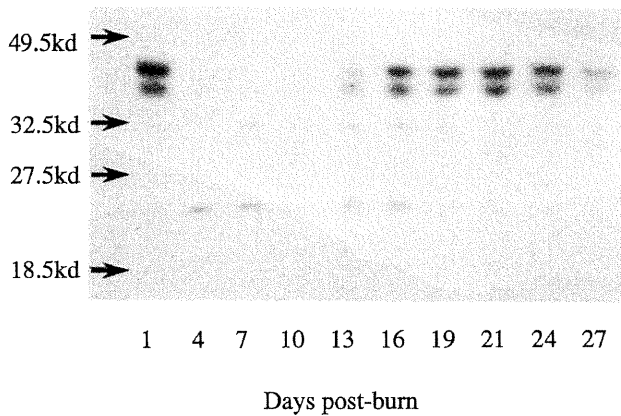


Figure 3. Ligand blotting of insulin-like growth factor binding proteins in one subject. Serum was loaded on a polyacrylamide gel; proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane and incubated with <sup>125</sup>I-insulin-like growth factor-I. *kd*, kilodaltons.

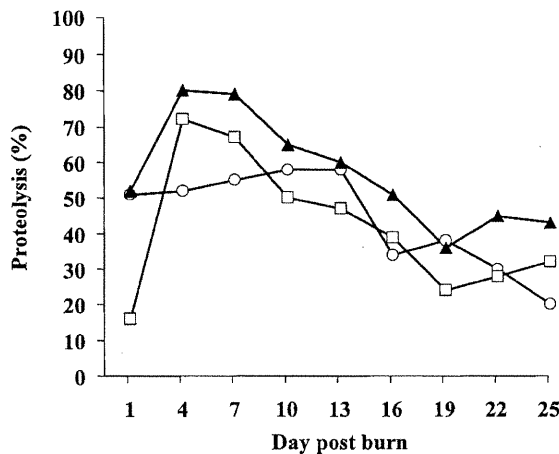


Figure 4. Proteolytic activity of the patient's sera for recombinant human insulin-like growth factor binding protein-3. Values are mean for two patients. There was a significant variation with time (analysis of variance,  $p < .01$ ). Proteolytic activity for recombinant human insulin-like growth factor binding protein-3 was 25% with sera from healthy volunteers. Group I (*triangles*), control group; group II (*squares*), patients with low fat nutritional support without fish oil; group III (*circles*), patients with low fat nutritional support and fish oil.

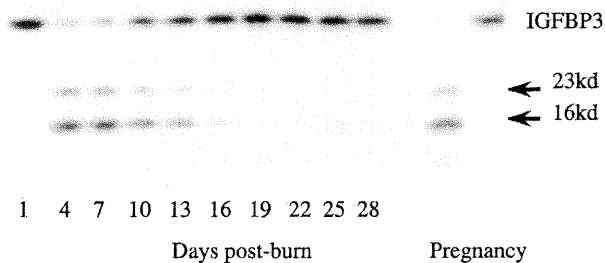


Figure 5. Proteolytic activity for insulin-like growth factor binding protein-3 of the serum of one patient every 3 days for 28 days. <sup>125</sup>I-insulin-like growth factor binding protein-3 (*IGFBP3*) (4500 cpm) was incubated with the test sample for 4 hrs; the samples were then run on a sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel and autoradiographed. *kd*, kilodaltons.

trations and the proteolysis of IGFBP-3 found in five of six subjects studied. The same relationship was found between the proteolytic activity and the IGFBP-3 con-

centration (measured with the ligand assay) in all of the patients studied. These findings suggest that serum proteolytic activity for IGFBP-3 in burn patients is

**O**ur results show that the amount and type of fat in nutritional support do influence the serum concentrations of insulin-like growth factor-1 in severely burn patients.

responsible, at least in part, for the observed fluctuations in both IGFBP-3 and IGF-I concentrations during the 4 wks post injury. A similar correlation between serum IGFBP-3 proteolytic activity and serum IGF-I concentration was reported in children with acquired immunodeficiency syndrome (11). The observation that IGFBP-3 measured by radioimmunoassay was markedly higher than normal throughout the study although the results of the ligand-binding assay clearly showed an opposite change suggests that the antibody used here, a polyclonal antibody raised against the peptidic portion of the IGFBP-3 molecule, cross-reacted with IGFBP-3 fragments. This may not be the only explanation, because immunoreactive IGFBP-3 increased during the second part of the study when proteolysis appeared to decrease. Better specificity for whole IGFBP-3 is needed to use this type of assay in critically ill patients. Our results are at variance with another study that did not find serum IGFBP-3 proteolysis in burn patients (2) although both IGF-I and IGFBP-3 were decreased. The discrepancy may be related to methodologic differences because Ghahary et al. (2) did not measure the serum proteolytic capacity for IGFBP-3 using recombinant IGFBP-3, but by incubating burn patients sera with serum from healthy individuals. In addition, the authors made no direct measurement of IGFBP-3 binding capacity for IGF-I.

The functional consequences of the observed changes in serum IGF-I and IGFBP-3 proteolysis in our patients is difficult to determine. Theoretically, a decrease in serum IGF-I concentration may lead to an increased availability of the growth factor to target tissues or, alternatively, to a diminution in this availabil-

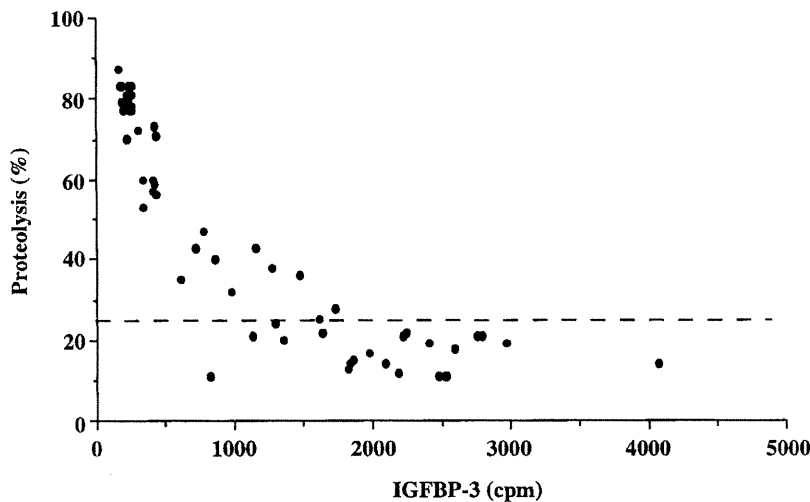


Figure 6. Relationship between serum insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) measured by ligand blotting assay and the proteolytic activity of the same serum samples for recombinant human insulin-like growth factor binding protein-3. Proteolytic activity of serum from healthy volunteers was 25%.

ity, because the half life of "free" IGF-I is only a few minutes, as compared with 15–20 hrs when associated with IGFBP-3 (32). There is evidence that serum IGFBP-3 proteolysis increases IGF-I bioavailability *in vitro* (33) but the bioavailability of "free" serum IGF-I in critically ill patients remains to be investigated.

In burn patients, a severe catabolic phase develops during the second and third weeks postinjury (34), followed by a "recovery phase" once the deep wounds have been grafted. It can be hypothesized that higher serum IGF-I concentrations may be beneficial to wound healing and protein balance during the recovery phase because increased serum IGF-I in burn patients receiving recombinant human growth hormone has been associated with improved cutaneous healing (35). In addition, a net uptake of IGF-I by leg tissues was measured in severely burned patients (36), lending support to the hypothesis of an increased bioavailability of the growth factor in these patients. In a previous publication (18), we had shown that fish oil administration had no effect on subject's nitrogen balance or 3 methyl-histidine levels and multivariate analysis in the present work confirmed that no relationship exists between these variables and serum IGF-I levels. In the present study, experimental nutritional supplementation with fish oil was administered for 30 days only; as a result, this design may have prevented us from seeing beneficial effects of higher IGF-I concentrations on wound healing

or protein metabolism during the recovery phase after burn injury.

In conclusion, our results show that the amount and type of fat in nutritional support do influence the serum concentrations of IGF-I in severely burn patients. The administration of omega-3 fatty acids results in a more rapid recovery of serum IGF-I. In addition, IGFBP-3 proteolysis occurs in burned patients and serum proteolytic activity for IGFBP-3 is strongly related to serum IGFBP-3 and serum IGF-I concentrations. Given the small number of patients studied here, our results should be considered as preliminary and a larger number of subjects should be investigated. Other mechanisms responsible for the decrease in serum IGF-I seen in burn patients may be hypothesized because IGF-I levels in our patients were lower than normal on day 1 postburn, whereas evidence of IGFBP-3 proteolysis appeared only between days 4 and 16.

## REFERENCES

1. Aribat T, Brazeau P, Davignon I, et al: Insulin-like growth factor-1 blood levels in severely burned patients: Effects of time post injury, age of patient and severity of burn. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1993; 39:583–589
2. Ghahary A, Fu S, Shen YJ, et al: Differential effects of thermal injury on circulating insulin-like growth factor binding proteins in burn patients. *Mol Cell Biochem* 1994; 135: 171–180
3. Clemmons DR: IGF binding proteins: Regu-

lation of cellular actions. *Growth Regul* 1992; 2:80–87

4. Clemmons DR: IGF binding proteins and their functions. *Mol Reprod Dev* 1993; 35: 368–374
5. Giudice LC, Farrell EM, Pham H, et al: Insulin-like growth factor binding proteins in maternal serum throughout gestation and in the puerperium: Effects of a pregnancy associated serum protease activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71:806–816
6. Hossenlop P, Segovia B, Lassarre C, et al: Evidence of enzymatic degradation of insulin-like growth factor-binding proteins in the 150K complex during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71:797–805
7. Davies SC, Wass JAH, Ross RJM, et al: The induction of a specific protease for insulin-like growth factor binding protein-3 in the circulation during severe illness. *J Endocrinol* 1991; 130:469–473
8. Davenport ML, Isley WL, Pucilowska JB, et al: Insulin-like growth factor-binding protein-3 proteolysis is induced after elective surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 590–595
9. Wojnar MM, Fan J, Frost RA, Gelato MC, Lang CH: Alterations in the insulin-like growth factor system in trauma patients. *Am J Physiol* 1995; 268:R970–R977
10. Jeevanadam M, Holaday NJ, Petersen SR: Plasma levels of insulin-like growth binding protein-3 in acute trauma patients. *Metabolism* 1995; 44:1205–1208
11. Frost RA, Nachman SA, Lang CH, et al: Proteolysis of IGFBP-3 in HIV-infected children who failed to thrive. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:2957–2962
12. Isley WL, Underwood LE, Clemmons DR: Changes in plasma somatomedin-C in response to ingestion of diets with variable protein and energy content. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1984; 8:407–411
13. Clemmons DR, Underwood LE, Dickerson RN, et al: Use of somatomedin-C/insulin-like growth factor-I measurements to monitor the response to nutritional repletion in malnourished patients. *Am J Clin Nutr* 1985; 41:191–198
14. Jeevanadam M, Holaday NJ, Petersen SR: Posttraumatic hormonal environment during total parenteral nutrition. *Nutrition* 1993; 9:333–338
15. Burgess EJ: Insulin-like growth factor 1: A valid nutritional indicator during parenteral feeding of patients suffering an acute phase response. *Ann Clin Biochem* 1992; 29: 137–144
16. Trocki O, Heyd TJ, Waymack JP, et al: Effects of fish oil on post burn metabolism and immunity. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1987; 11:521–528
17. Mochizuki H, Trocki O, Dominiononi L, et al: Optimal lipid content for enteral diets following thermal injury. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1987; 8:638–646
18. Garrel DR, Razi M, Lariviere F, et al: Improved

- clinical status and length of care with low-fat nutrition support in burn patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1995; 19:482-491
19. Curreri PW: Nutritional support of burn patients. *World J Surg* 1978; 2:215-222
  20. Garrel DR, DeJonge L: Thermogenic response to feeding in severely burned patients: relation to resting metabolic rate. *Burns* 1993; 19:467-472
  21. Aribat T, Lapiere H, Dubreuil P, et al: Insulin-like growth factor-I concentration in Holstein female cattle: Variations with age, stage of lactation, and growth hormone-releasing factor administration. *Domest Anim Endocrinol* 1990; 7:93-102
  22. Hossenlopp P, Seurin D, Segovia-Qinson B, et al: Analysis of serum insulin like growth factor binding proteins using western blotting: Use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding studies. *Anal Biochem* 1986; 154:138-143
  23. Fournier K, Tavera C, Brazeau P, et al: Local induction of an insulin-like growth factor binding protein-3 degrading activity in the course of wound healing. *Wound Repair Regen* 1996; 101:252-258
  24. Lamson G, Giudice LC, Rosenfeld RG: A simple assay for proteolysis of IGFBP-3. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72:1391-1393
  25. Clemmons DR, Underwood LE: Nutritional regulation of IGF-I and IGF binding proteins. *Annu Rev Nutr* 1991; 11:393-412
  26. Donahue SP, Phillips LS: Response of IGF-1 to nutritional support in malnourished hospital patients: A possible indicator of short term changes in nutritional status. *Am J Clin Nutr* 1989; 50:962-969
  27. Hawker FH, Stewart PM, Baxter RC, et al: Relationship between somatomedin-like growth factor levels to conventional nutritional indices in critically ill patients. *Crit Care Med* 1987; 15:732-736
  28. Kinsella JE: Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoids: Potential effects on the modulation of inflammatory and immune cells: An overview. *Nutrition* 1990; 6:24-44
  29. Johnston PV, Marshall LA: Dietary fat, prostaglandins and the immune response. *Prog Food Nutr Sci* 1984; 8:3-12
  30. Davenport ML, Isley WL, Pucilowska JB, et al: Insulin-like growth factor binding protein-3 proteolysis is induced after elective surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 590-595
  31. Baxter RC, Skiver L: Altered ligand specificity of proteolysed insulin-like growth factor-binding protein-3. *Biochem Biophys Res Com* 1993; 196:1267-1273
  32. Blat C, Villaudy J, Binoux M: *In vivo* proteolysis of serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) binding protein-3 results in increased availability of IGF to target cells. *J Clin Invest* 1994; 93:2286-2290
  33. Lamson G, Giudice LC, Cohen P, et al: Proteolysis of IGFBP-3 may be a common regulatory mechanism of IGF action *in vivo*. *Growth Regul* 1993; 3:91-95
  34. Demling RN: Burns. *N Engl J Med* 1985; 313:1389-1398
  35. Herndon DN, Hawkins HK, Nguyen TT, et al: Characterisation of growth hormone enhanced donor site healing in patients with large cutaneous burns. *Ann Surg* 1995; 221:649-656
  36. Lang CH, Fan J, Frost RA, et al: Regulation of the insulin-like growth factor system by insulin in burn patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:2474-2480