

Université de Montréal

Étude de l'effet d'une diète faible en lipides
sur l'immunodéficience engendrée par une brûlure grave

par
Ariane Mineau

Département de Nutrition
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de M.Sc.
En Nutrition

Décembre 2006

© Ariane Mineau, 2006



Qu

145

U58

2007

V005

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude de l'effet d'une diète faible en lipides
sur l'immunodéficience engendrée par une brûlure grave

Présenté par :

Ariane Mineau

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jean-Marie Ekoé
président-rapporteur

Dr. Dominique Garrel
Directeur de recherche

Dr. Jacques Bernier.
Membre du jury

RÉSUMÉ

Les brûlures sévères entraînent des complications au niveau du système immunitaire, notamment un phénomène d'immunosuppression. Elles affectent la réponse inflammatoire qui se développe aux tissus endommagés, ainsi que la réponse lors d'infections. Elles induisent également des altérations au niveau physiologique comme l'augmentation de la perte d'azote, un état de malnutrition, un métabolisme stimulé ; ces conditions pouvant entraîner la mort suivant l'intensité et la durée de ces phénomènes. La nutrition représente un facteur déterminant quant à la prévention de ces troubles et des infections.

Nous avons étudié l'effet d'une diète faible en lipides sur l'immunosuppression et le stress oxydatif qui suivent une brûlure. Des souris C3H/HeN reçurent une brûlure sévère ou une « fausse » brûlure et furent nourries avec une diète à 5% de gras pendant 10 jours ou 1% de gras pendant des périodes variant de 4 à 10 jours. La prolifération des splénocytes ainsi que la concentration de NO dans les cultures cellulaires furent évaluées. Aucune relation significative ne fût observée entre la période d'administration de la diète et la prolifération des splénocytes. L'effet de la diète 1% sur la prolifération et le stress oxydatif n'a pu être démontré. L'injection de lipopolysaccharide, endotoxine des bactéries Gram négatif, à des groupes de souris brûlées et non brûlées soumises à ces deux diètes n'a pu prouver l'action bénéfique d'une diète faible en lipides.

Mots-clés : nutrition, brûlure, lipides, immunosuppression, LPS, stress oxydatif.

ABSTRACT

Acute thermal injuries induce an impairment of the immune system and the inflammatory response and lead to the development of immunosuppression that can induce in turn complications and infections. They induce physiological alterations within the body like an increase in nitrogen losses, a state of malnutrition and an increase of the metabolic rate. Those conditions can lead to the death of the patient depending on the intensity and length of said troubles. Nutrition represents a determining factor in the prevention of those physiological troubles and the cases of infection induced after burn injury.

We studied the effects of a low-fat diet on the immunosuppression and oxidative stress following burn injuries. C3H/HeN mice were inflicted an acute burn injury then fed a regular diet of 5% of fat for the 10 days of the experiment or a low-fat diet (1%) from 4 days to 10 days post-injury. Splenocyte proliferation and NO concentration were assessed. No significant relation between the length of administration of the diet and the splenocyte proliferation was obtained. The effect of the low-fat diet on splenocyte proliferation or oxidative stress following burn injury failed to be proven. The injection of lipopolysaccharide to groups of burn injured and non injured mice receiving the same two diets couldn't show any beneficial action from the administration of a low-fat diet either.

Keywords : nutrition, burn, lipids, immunosuppression, LPS, oxydative stress.

TABLE DES MATIÈRES

| | | |
|------------|---|----------|
| I. | INTRODUCTION..... | 1 |
| II. | CONTEXTE THÉORIQUE..... | 4 |
| | | |
| I. | LA BRÛLURE..... | 5 |
| 1. | La plaie..... | 5 |
| 1.1 | Les zones de la brûlure..... | 5 |
| 1.2 | La sévérité..... | 6 |
| 2. | Conséquences physiologiques sur l'organisme..... | 8 |
| 2.1 | Troubles métaboliques..... | 8 |
| 2.1.1 | Réaction inflammatoire..... | 8 |
| 2.1.2 | Hypermétabolisme..... | 9 |
| 2.1.3 | Conséquences hormonales..... | 11 |
| 2.2 | Complications..... | 11 |
| 2.2.1 | Infections..... | 11 |
| 2.2.2 | Sepsis et syndrome de réponse inflammatoire systémique..... | 12 |
| 2.2.3 | Défaillance multiple des organes..... | 13 |
| 3. | Prise en charge et gestion d'une brûlure..... | 13 |
| | | |
| II. | BRÛLURE ET SYSTÈME IMMUNITAIRE..... | 15 |
| 1. | Immunosuppression..... | 16 |
| 2. | Sites de l'inflammation..... | 16 |
| 2.1 | La plaie..... | 17 |
| 2.2 | Intestin..... | 18 |
| 2.3 | Poumons..... | 19 |
| 3. | Les médiateurs de l'inflammation..... | 19 |
| 3.1 | Les Macrophages..... | 20 |
| 3.2 | NO et stress oxydatif..... | 21 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3 Les eicosanoïdes..... | 22 |
| 3.4 Les lymphocytes..... | 24 |
| 3.5 Les Cytokines..... | 26 |
| 3.5.1 Les cytokines pro et anti-inflammatoires..... | 27 |
| 3.6 Radicaux libres d'oxygène..... | 29 |
| 4. Conséquences sur l'organisme..... | 30 |
| | |
| III. SUPPORT NUTRITIONEL..... | 31 |
| 1. Besoins énergétiques..... | 31 |
| 1.1 Hypermétabolisme..... | 31 |
| 1.2 Évaluation de la dépense énergétique..... | 32 |
| 1.3 Voies d'administration..... | 32 |
| 2. Acides Gras..... | 33 |
| 2.1 Influence des acides gras sur le système immunitaire..... | 33 |
| 2.1.1 Synthèse des eicosanoïdes..... | 34 |
| 2.1.2 Synthèse des acides gras..... | 34 |
| 2.2 Le type d'acides gras..... | 35 |
| 2.2.1 Acides gras polyinsaturés..... | 35 |
| 2.2.2 Acides gras monoinsaturés..... | 37 |
| 2.3 La quantité d'acides gras..... | 37 |
| | |
| III. MATÉRIEL ET MÉTHODES..... | 39 |
| IV. RÉSULTATS..... | 46 |
| 1. Consommation de nourriture et variation du poids des souris..... | 48 |
| 2. Prolifération des splénocytes ex vivo en réponse à divers stimuli selon la diète administrée..... | 59 |
| 3. Production de NO in vitro par les splénocytes en réponse à divers stimuli selon la diète administrée..... | 70 |
| 4. Évaluation de la résistance à l'infection par LPS selon la diète administrée... | 80 |
| | |
| V. DISCUSSION..... | 86 |
| VI. CONCLUSION..... | 99 |

VII. BIBLIOGRAPHIES.....101
VIII. ANNEXES.....110

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau I : Apport alimentaire cumulé au cours de 10 jours pour chaque groupe lors de la première série d'expériences..... | 50 |
| Tableau II : Apport alimentaire cumulé au cours de 10 jours pour chaque groupe lors de la série d'expériences contrôle. | 51 |
| Tableau III : Apport alimentaire cumulé au cours de 10 jours pour chaque groupe lors de la seconde série d'expériences..... | 52 |
| Tableau IV : Variation de poids moyenne des souris par groupe lors de la première série d'expériences..... | 56 |
| Tableau V : Variation de poids moyenne des souris par groupe lors de l'expérience contrôle..... | 57 |
| Tableau VI : Variation de poids moyenne des souris par groupe lors de la seconde série d'expériences..... | 58 |
| Tableau VII : Apport alimentaire cumulé au cours de 10 jours pour chaque groupe avant injection de LPS..... | 84 |
| Tableau VIII : Variation de poids moyenne des souris par groupe entre le jour de la brûlure et le jour de l'injection de LPS..... | 84 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1: Effets de la brûlure et de l'administration d'une diète faible en gras sur la réponse des splénocytes après activation par des mitogènes: (A) LPS, (B) ConA, (C) H57. Première série d'expériences..... | 64 |
| Figure 2: Effets de la brûlure et de l'administration d'une diète faible en gras sur la réponse des splénocytes après activation par des mitogènes: (A) LPS, (B) ConA, (C) H57. Expérience contrôle. | 66 |
| Figure 3: Effets de la brûlure et de l'administration d'une diète faible en gras sur la réponse des splénocytes après activation par des mitogènes: (A) LPS, (B) ConA, (C) H57. Seconde série d'expériences..... | 68 |
| Figure 4 : Évaluation du stress oxydatif après une brûlure grave selon la production de NO. Première série d'expériences. | 74 |
| Figure 5: Évaluation du stress oxydatif après une brûlure grave selon la production de NO. Expérience contrôle. | 76 |
| Figure 6 : Évaluation du stress oxydatif après une brûlure grave selon la production de NO. Seconde série d'expériences..... | 78 |
| Figure 7 : Taux de survie selon le temps après injection intra-péritonéale de 250µg de LPS..... | 80 |
| Figure 8 : Taux de survie selon le temps après injection intra-péritonéale de 250µg de LPS..... | 85 |

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AA: Acide arachidonique
ADGL: Acide di-homo- γ -linoléinique
AGL: Acide γ -linoléinique
AMP: Adénosine monophosphate
CBG: Cortocosteroid-binding globulin
CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité
cNOS: NO synthase constitutive
ConA: Concanavalin A
COX: Cyclooxygénase
Cpm: Comptes par minute
DHA: Acide docohexaénoïque
EPA: Acide eicopentaénoïque
FBS: Foetal Bovine Serum
HBSS: Hank's Buffered Salt Solution
IFN- γ : Interféron γ
IL-1: Interleukine-1
IL-1RA: Antagoniste du récepteur de l'interleukine-1
IL-2: Interleukine-2
IL-4: Interleukine-4
IL-6: Interleukine-6
IL-10: Interleukine-10
IL-12: Interleukine-12
Immunoglobuline G: IgG
iNOS: NO synthase inductible
ip: Intra-péritonéal
L_B: Lymphocytes B
LPS: Lipopolysaccharide
L_T: Lymphocytes T

LTB₄: Leukotriène B₄

NK: Cellule tueuse naturelle

NO: monoxyde d'azote ou oxyde nitrique

PG: Prostaglandine

PGE₂: Prostaglandine E₂

PUFA: Acide gras polyinsaturé (Polyunsaturated fatty acid)

Rpm: Rotations par minutes

SIRS: Syndrome de réponse inflammatoire systémique

TBSA: Surface corporelle totale brûlée

Th1: Lymphocyte T auxiliaire 1

Th2: Lymphocyte T auxiliaire 2

TNF α : Facteur de nécrose de tumeur

REMERCIEMENTS

Je remercie mon directeur, le Docteur Dominique Garrel, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma maîtrise au sein de son laboratoire.

Merci à Ana De Oliveira pour son aide précieuse et sa bonne humeur tout au long de cette maîtrise, ainsi que la formation et les connaissances qu'elle m'a apportées. Merci également au personnel de l'animalerie pour leur aide fortement appréciée tout au long de ce projet.

Merci à Lucie Oden pour sa précieuse amitié ainsi que son constant support au cours de ces dernières années.

I. INTRODUCTION

Suite à une injure thermique la première barrière de défense de l'organisme, la peau, se trouve détruite, rendant l'organisme plus vulnérable aux pathogènes opportunistes environnants et au développement d'infections. Les progrès réalisés au niveau des soins procurés aux patients ont permis de réduire significativement la morbidité et la mortalité liée à la brûlure. Aujourd'hui les complications qui en découlent, principalement les infections et leur impact sur l'organisme, représentent la cause majeure de décès dans cette population de patients. Une brûlure grave donne lieu à une réponse immédiate à l'échelle de l'organisme qui induit le développement de nombreux changements physiologiques. Ces derniers incluent une réponse inflammatoire soutenue qui entraîne l'activation d'une cascade inflammatoire qui à son tour contribue au développement d'un état d'immunosuppression (1) et une augmentation prononcée du métabolisme pouvant induire un état de malnutrition si les apports nutritionnels sont inadéquats et empirer la déficience immunitaire présente. (2)

Cette défense immunitaire altérée après une brûlure grave contribue à une susceptibilité accrue aux infections, et peut prédisposer les patients à un état de sepsis, voire conduire à une défaillance viscérale multiple et à la mort. (3-7) Si le traitement et la prévention des infections demeurent un aspect primordial pour le traitement des grands brûlés, l'idéal serait de pouvoir éradiquer le développement de cette immunosuppression. La nutrition des patients souffrant de brûlures sévères est reconnue comme étant un facteur déterminant au niveau de la vitesse de guérison des blessures et de la durée des épisodes d'infections. (8-12) De précédentes études ont permis de comparer les effets de diètes variant au niveau de leur contenu en lipides sur le système immunitaire, ainsi que les différents paramètres entrant en jeu lors de brûlures sévères tel le stress oxydatif. (8) La consommation d'une diète pauvre en gras (1% de gras) résulte en des effets positifs en ce qui a trait à la réponse immunitaire et le stress oxydatif, dont l'intensité se trouve réduite. (8) Les précédentes études se basaient sur une période de 10 jours pour l'administration de la diète faible en gras depuis la brûlure de l'animal car il a été démontré que c'est à ce moment que se produit le pic d'immunosuppression. (13) Nous nous sommes donc penché sur les avantages d'un support nutritionnel adéquat après une brûlure grave, plus particulièrement sur la quantité requise d'acides gras qui exercerait des effets

immunomodulateurs bénéfiques, ainsi que la période nécessaire d'administration pour l'élaboration de cette action bénéfique. Ces différents délais au niveau de l'administration de la diète ont pour but de comparer l'efficacité de celle-ci selon les périodes données. Les résultats obtenus permettraient ainsi de déterminer le temps minimal requis au cours duquel l'animal doit recevoir la diète faible en gras pour que celle-ci ait des effets bénéfiques au niveau de l'immunosuppression et de la réduction du stress oxydatif. Est-elle primordiale seulement au cours de la phase aiguë de l'immunosuppression qui suit la brûlure, ou bien est-il nécessaire d'administrer la diète sur une longue période pour observer le maintien de son efficacité? Le temps requis par la diète pour la diffusion et le maintien de ses effets serait également un moyen d'étudier la localisation de l'action de la diète. S'agit-il d'un effet direct au niveau de la barrière intestinale ou bien cela concerne-t-il les voies métaboliques ultérieures?

II. CONTEXTE THÉORIQUE

I. LA BRÛLURE

Les brûlures graves, qui couvrent au moins 20% de la surface corporelle totale (total body surface area ou TBSA), constituent le stress le plus sévère qu'un organisme puisse subir et entraînent des changements locaux et systémiques au sein de l'organisme (14). Selon leur étendue et leur profondeur, les brûlures peuvent bouleverser l'homéostasie et altérer significativement la physiologie de l'organisme au niveau métabolique, hormonal, ou immunitaire.

1. La plaie

Une blessure thermique peut être causée par des flammes, un liquide trop chaud, des rayonnements, ou encore être de nature électrique ou chimique. Toutefois, quelle que soit son origine elle peut entraîner de graves lésions.

1.1 Les zones de la brûlure

Les transferts de chaleur depuis la source, lorsque la brûlure se produit, conduisent à différentes zones de sévérité au niveau des tissus endommagés. (16)

Le centre de la plaie, la surface ayant reçu la quantité de chaleur la plus importante et où le dommage est le plus sévère, se définit comme la zone de coagulation ou de nécrose et se caractérise par la mort irréversible des cellules épithéliales. (14, 15) Autour s'étend la zone de « stasis », potentiellement récupérable, qui se caractérise par une réaction inflammatoire marquée et une diminution de la perfusion tissulaire. Si une infection prononcée se développe ou si la plaie vient à s'assécher, cette zone peut être détruite, ce qui souligne d'autant plus l'importance des soins administrés après une brûlure. Le but de la ressuscitation par des fluides a pour but d'augmenter la perfusion des tissus dans cette zone et ainsi prévenir des dommages irréversibles. (14, 15) À la périphérie se situe la zone d'hyperémie, zone la moins affectée et pour laquelle on peut attendre un

rétablissement spontané précoce à moins d'un épisode de sepsis sévère ou d'une hypoperfusion prolongée. (14, 15)

1.2 La sévérité

La sévérité d'une brûlure se détermine d'une part selon l'étendue de la surface corporelle affectée ainsi que par la profondeur de l'agression. À cela s'ajoute d'autres variables telles l'endroit de la brûlure au niveau du corps, l'âge de la personne touchée ainsi que son état de santé précédent la brûlure. (15, 18, 19)

La profondeur d'une brûlure se classe selon l'épaisseur de la peau qui a été touchée, soit si seul l'épiderme a été affecté ou bien si la lésion s'étend au derme voire aux tissus sous-jacents. (17) Elle constitue le facteur primaire dans la décision concernant le type de soins qui devront être apportés au patient. (17) Sa sévérité dépend du degré d'exposition à la source de chaleur que la peau a reçue, soit son intensité et la durée du contact, et la nature de celle-ci. L'eau conduisant mieux la chaleur que l'air, une brûlure infligée par un liquide est plus susceptible de causer des dommages importants car la chaleur humide se répandra plus rapidement. (17)

Une brûlure superficielle ne met en cause que la partie supérieure de la peau, l'épiderme, et éventuellement une mince portion du derme. Ce type de brûlure est fréquemment engendré par l'exposition aux radiations UV du soleil (coups de soleil) et la guérison ne prend généralement pas plus d'une semaine, ne nécessite pas de traitement particulier et ne laisse pas de cicatrice. (17)

Les brûlures à épaisseur partielle (« partial thickness »), impliquent la destruction de l'épiderme ainsi qu'une portion significative du derme. Elles sont considérées comme superficielles si au moins 2/3 du derme reste inaffecté ou bien profondes dans le cas où la majorité de celui-ci est détruit. Dans le cas des brûlures superficielles, on peut éventuellement observer la formation de cloques qui résultent de la libération de larges quantités de plasma par les micro-vaisseaux qui ont été atteints. (17) Ce phénomène ne s'observe pas si la brûlure est profonde car le tissu mort est épais et adhère à la couche du

derme viable. Le plasma libéré par les vaisseaux ne peut donc soulever la peau morte et entraîner la formation de cloques.

Les brûlures d'épaisseur totale (ou « full thickness ») impliquent la destruction complète des couches du derme et de l'épiderme. Elles engendrent des changements physiologiques importants au niveau de tout l'organisme. C'est le degré de brûlure sur lequel nous nous sommes basés au cours de notre étude.

Enfin une dernière catégorie de brûlures est à mentionner, les brûlures subdermales, qui comprennent la destruction totale du derme et de l'épiderme et s'étendent jusqu'aux tissus sous-jacents voire jusqu'aux muscles et aux os. Dans ces cas extrêmes le traitement inclus souvent le recours à l'amputation selon l'emplacement du dommage. (17)

Cette classification par épaisseur de peau brûlée, qui correspond à l'échelonnage par degrés (1^{er} au 4^{ème}), n'est pas le seul facteur à prendre en considération lors de l'évaluation de la sévérité d'une brûlure. L'étendue de la plaie demeure un facteur crucial. Elle se définit par le pourcentage de surface corporelle totale brûlée (% TBSA) et peut être évaluée en se basant sur la règle dite des 9. La surface corporelle peut se diviser en segments de 9%. 9% pour la tête, pour chaque bras, 18% pour la face antérieure du tronc puis pour la face postérieure, 18% de même pour chaque jambe et enfin 1% pour la surface du cou et les organes génitaux. (17) Il existe une forte corrélation entre l'étendue de la brûlure et le taux de mortalité. (20)

L'âge joue également un facteur déterminant quant à de l'issue du patient. Les enfants en bas âge ainsi que les personnes âgées tendent à avoir un taux de mortalité plus élevé après avoir subi une lésion thermique majeure comparé aux enfants plus âgés et aux adultes. (17) Ceci peut être relié en partie à une épaisseur de peau plus mince qui rend cette population plus sensible à des brûlures graves, ainsi qu'à une résistance moindre aux complications physiologiques qui découlent d'une lésion thermique grave. La fonction immunitaire est également moins active chez ces deux populations. (21)

Un autre facteur important à prendre en compte dans l'évaluation de la sévérité d'une brûlure est la présence de blessures par inhalation de fumée qui accroît significativement l'incidence de la mortalité. Une blessure par inhalation constitue en une blessure aux voies respiratoires et aux poumons, et résulte généralement de l'exposition à des composés chimiques ou à des feux de véhicules. (14) La présence de ce type de blessure empêche un support nutritionnel par voie entérale qui, comme nous le mentionnerons plus loin, joue un rôle primordial dans la prévention des complications reliées à une brûlure grave. L'incidence de blessure par inhalation augmente avec l'étendue de la brûlure. Elle se retrouve chez 2/3 des patients qui ont été brûlés par des flammes et dont l'étendue dépasse 70% TBSA. (14)

2. Conséquences physiologiques sur l'organisme

Une brûlure grave entraîne un vaste changement d'un point de vue physiologique au sein de l'organisme, réaction destinée à lutter contre l'injure thermique et ses effets. On observe en premier lieu l'induction d'une réaction inflammatoire dite phase aiguë qui peut durer entre 3 à 5 jours, suivie d'une phase d'hypermétabolisme qui peut se prolonger sur plusieurs semaines.

2.1 Troubles métaboliques

La réaction de stress qui accompagne une brûlure sévère se compose d'altérations métaboliques, endocriniennes et immunitaires et perturbe l'homéostasie de l'organisme.

2.1.1 Réaction inflammatoire

L'altération au niveau des tissus suite à une brûlure grave engendre une réponse inflammatoire, considérée comme la phase aiguë. Elle s'étend de 3 à 5 jours et a pour fonction de dépêcher à la plaie les éléments du système immunitaire essentiels à la lutte contre les infections pour ensuite promouvoir la réparation des tissus endommagés. Le

terme de phase aiguë réfère à un ensemble de changements locaux et systémiques de types métaboliques, endocriniens et neurologiques qui permettent à l'organisme de réagir à des stimuli tels une infection, une inflammation stérile (maladie auto-immune) ou un traumatisme comme la brûlure. (22)

Cette réponse physiologique marquée inclue un phénomène de vasodilatation induit par des médiateurs de l'inflammation aux alentours de la plaie. Ceci a pour but de dissiper la chaleur reçue par la peau et d'améliorer le transport des métabolites nécessaires pour supporter les besoins de la plaie au niveau métabolique et immunitaire. (15) Cette vasodilatation et la libération de métabolites de l'acide arachidonique entraînent une augmentation de l'activité osmotique extravasculaire qui est associée à la formation d'œdèmes et à l'infiltration de cellules de l'inflammation au niveau de la plaie. (15, 23) S'en suit l'activation du système de coagulation et l'accumulation de plaquettes activées qui sont les premières cellules au niveau de la plaie à libérer les cytokines qui vont activer à leur tour les macrophages et fibroblastes. L'activation de signaux afférents est responsable de la sensation de douleur. L'œdème et l'inflammation induits par la brûlure peuvent affecter les surfaces tissulaires non brûlées dans le cas de brûlures sévères dont l'étendue dépasse 25%. (23)

La réaction inflammatoire et les médiateurs qui entrent en jeu dans ce processus physiologique après une brûlure seront revus plus en détail dans la seconde partie du contexte théorique.

2.1.2 Hypermétabolisme

L'inflammation systémique induite par la brûlure stimule une réponse hypermétabolique qui est caractérisée par une dépense énergétique exagérée et peut s'étendre sur plusieurs semaines. (17, 24) Le métabolisme de base après une brûlure peut augmenter jusqu'à 3 fois sa valeur originale. (14) Il résulte en un catabolisme massif des protéines qui provoque des pertes massives de masse maigre conduisant à une diminution de la fonction du muscle squelettique et entraîne donc une convalescence prolongée. (4, 22) S'ajoute à cela une lipolyse importante. (4)

La peau blessée est beaucoup plus perméable aux fluides et la perte de fluides par évaporation chez les brûlés contribue à ce taux métabolique accru. (4) On dénote également une augmentation de la consommation d'oxygène. (4) Cette condition nécessite un apport alimentaire, par voie entérale dans la mesure du possible, rapide et agressif dans le but de préserver l'intégrité de la muqueuse intestinale et contribuer à réduire le catabolisme prononcé. (14) Cette augmentation des dépenses énergétiques au repos est directement reliée à l'étendue de la brûlure subite, mais cette association n'est valable que jusqu'à 60% TBSA. Une brûlure d'étendue supérieure à 60% TBSA ne semble pas induire une dépense énergétique plus marquée. (25) Ce plafond de la dépense d'énergie après une certaine surface de tissu brûlé pourrait être lié au fait que l'organisme humain possède une limite physiologique quant à la production d'énergie. Une blessure ou stress sévères peuvent excéder la capacité maximale de production d'énergie de l'organisme, la déficience consécutive en énergie pouvant ainsi engendrer potentiellement la mort via la mort cellulaire et défaillance des organes. (24)

Cet état d'hypermétabolisme peut contribuer à l'augmentation de l'incidence de la défaillance viscérale multiple et de la mortalité chez les patients brûlés si, par exemple, le patient subit un stress physiologique supplémentaire ou est placé dans un environnement froid. (25) Ceci induit une dépense d'autant plus accrue d'énergie que l'organisme n'est pas nécessairement en mesure de fournir. La réponse systémique s'accompagne de changements cardiovasculaires. À cela se combine des changements cardiovasculaires qui sont caractérisés par l'augmentation de la perméabilité capillaire et la diminution de la contractilité myocardique. Une perte de fluide au niveau de la plaie induit une hypotension systémique et une hypo perfusion des organes. (14) À cela s'ajoutent des changements respiratoires, au cours desquels les médiateurs de l'inflammation peuvent causer une broncho-constriction qui peut aboutir, lors de brûlures sévères, au syndrome de détresse respiratoire adulte. (14)

2.1.3 Conséquences hormonales

La brûlure déclenche une activation du système endocrinien. La suppression de la réponse immunitaire qui succède à une injure thermique serait en partie due à l'augmentation des taux corticostéroïdes et de catécholamines. (26, 27) Ces hormones de stress voient leurs taux amplifier après une brûlure sous l'action de cytokines et traduisent de la manifestation hormonale de l'hypermétabolisme. La brûlure va entraîner une réduction des taux circulants de corticosteroid-binding globulin (CBG) ce qui à l'inverse va entraîner l'augmentation de cortisol libre. (28) Le cortisol libre participe aux réactions de lipolyse et de catabolisme protéique qui suivent la brûlure. Une diète faible en gras contribuerait à diminuer la fraction de cortisol libre en rétablissant les niveaux de CBG.

2.2 Complications

Les progrès réalisés dans les soins administrés aux patients au niveau de la prise en charge, du support nutritionnel, et des soins spécifiques au niveau des plaies ont permis de réduire significativement la morbidité et la mortalité. (17) Toutefois, la réponse inflammatoire et le phénomène d'immunosuppression engendrés par le choc de la brûlure conduisent à une susceptibilité accrue aux infections et contribuent au développement de complications tel les états de sepsis et la défaillance viscérale multiple. (1) Ces derniers restent un problème majeur et la cause la plus fréquente de morbidité et mortalité. Il est donc primordial au niveau de la prise en charge des patients, de prévenir au mieux les infections ou de les traiter dans les plus brefs délais.

2.2.1 Infections

La plaie est stérile tout de suite après l'insulte thermique ou dépourvue de contamination microbienne majeure. (15) Suivant la sévérité de la brûlure, des bactéries Gram positives peuvent avoir survécues dans les profondeurs des follicules pileux et peuvent ainsi coloniser la plaie au cours des premières 48h, d'autant plus si aucun agent

antimicrobien n'a été appliqué au niveau de la plaie. (29, 30) De plus, l'avascularité du tissu brûlé empêche la livraison de cellules immunitaires actives et d'antibiotiques par le sang à l'escarre et contribue donc à accroître la susceptibilité de cette zone aux infections. (31)

En général la plaie est colonisée au cours de la première semaine par des organismes de type Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus Pyogenes*) puis ces derniers sont supplantés par des organismes de type Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) lors de la seconde semaine. (15) Les infections sont classées selon les organismes qui les causent, ainsi que la profondeur de l'invasion qui s'en suit et la réponse tissulaire à cette invasion.

Les infections peuvent être évitées ou minimisées par l'application d'un agent antimicrobien au niveau de la plaie qui permet de maintenir de bas niveaux de flore microbienne. (14) Le sulfadiazine d'argent est l'agent le plus communément utilisé en raison de sa faible toxicité et de sa facilité d'utilisation. Un traitement chirurgical communément employé pour les brûlures sévères et profondes consiste à exciser le tissu brûlé et à refermer la plaie à l'aide de greffes de peau autologue, de peau en provenance de cadavres (mais cette option représente un risque de maladie [14, 32]) ou de substituts artificiels de peau. (14) Une telle chirurgie majeure altère les mécanismes de défense de l'organisme et le prédispose au développement de complications infectieuses, mais une excision précoce du tissu brûlé peut améliorer l'issue du patient et contribuer sur une plus longue période à la réduction de la probabilité d'infections.

2.2.2 Sepsis et syndrome de réponse inflammatoire systémique

La réponse inflammatoire qui est déclenchée par la brûlure peut avoir des effets autant bénéfiques que délétères si elle se prolonge et est exagérée. Si l'immunodéficience rend le patient susceptible aux infections, une réaction inflammatoire trop puissante peut contribuer au développement de syndromes comme le syndrome de réponse inflammatoire systémique ou SIRS. (33-35) C'est une réponse inflammatoire systémique, initiée par les cytokines pro-inflammatoires, qui se caractérise par une circulation hyper

dynamique accompagnée d'un rendement cardiaque élevé et d'une faible résistance vasculaire systémique. (23) C'est une cause majeure de mortalité chez les brûlés. (4) Ces caractéristiques se retrouvent dans le cas de sepsis, mais la différence entre ces deux conditions repose en général sur l'incapacité de déceler des bactéries chez les patients en état de SIRS. (23) Dans le cas du sepsis, son incidence au niveau de la plaie est généralement proportionnelle à l'étendue de la brûlure. Elle sera influencée par l'âge du patient et la profondeur de la brûlure. (31)

2.2.3 Défaillance multiple des organes

Une grande majorité des cas de défaillance viscérale est induite par des cas d'infections. Les blessures cutanées comme une brûlure engendrent une perte de fluide importante et induisent la libération de médiateurs de l'inflammation qui peuvent représenter un risque majeur en cas de dissémination aux organes centraux, en conduisant ultimement à la défaillance viscérale multiple. (4)

3. Prise en charge et gestion d'une brûlure

Le type de brûlure et son étendue influencent grandement les changements locaux au niveau de la plaie mais ces derniers dépendent aussi de la thérapie locale et générale qui sera mise en œuvre pour la gestion de la plaie. (15) Les avancements au niveau du traitement initial du choc induit par la brûlure, associés au contrôle des infections et la fermeture précoce de la plaie, ont contribué à faire baisser l'incidence de la morbidité et de la mortalité. (4)

Les soins à administrer aux patients afin de minimiser l'étendue des dommages et promouvoir la guérison incluent une ressuscitation par des fluides adéquate, qui permet de maintenir la perfusion des tissus (4), une prise en charge appropriée des éventuelles blessures par inhalation, un support nutritionnel approprié (qui sera revu au point III), le contrôle des infections, et enfin l'excision du tissu brûlé et la fermeture de la brûlure à

l'aide de greffes de peau ou de substituts. (15) Des agents thérapeutiques comme des inhibiteurs de métabolites ou anticorps contre certaines cytokines sont à l'essai. Toutefois les nombreux systèmes physiologiques activés après une brûlure et qui interagissent entre eux, et ce associé à la complexité de la réaction inflammatoire, rendent difficile l'éventualité d'un traitement consistant à bloquer certains médiateurs uniquement. Une thérapie visant plusieurs constituants de la réponse à une brûlure grave auraient probablement plus de succès qu'une monothérapie. (36)

La plaie en elle-même représentant un facteur immunodéprimant, l'excision de l'escarre suivie de la fermeture de la plaie dans le cas des brûlures profondes est nécessaire. (37-39) L'excision de la plaie et les greffes contribuent à diminuer l'incidence des complications reliées à la brûlure et ainsi à augmenter le taux de survie des patients. (40, 41) L'âge du patient représente un facteur important dans le succès de cette procédure. (42) Le moment auquel le patient subit cette chirurgie s'avère aussi primordial quant à l'issue clinique. Une excision relativement précoce démontre des effets bénéfiques sur la fonction immunitaire, en revanche attendre trop longtemps pour l'excision ne permettra pas de restaurer une fonction immunitaire adéquate. (43-45) Les avantages d'une excision précoce proviendraient de l'habileté de cette procédure à normaliser la réponse du médiateur inflammatoire TNF α (facteur de nécrose de tumeur) et à maintenir la fonction de barrière de la peau. (42) Toutefois, la procédure entraînant une perte de sang conséquente, ses avantages et inconvénients quant à la santé du patient doivent être pesés. (21) Les transfusions sont associées à des risques d'infections et de telles chirurgies massives peuvent provoquer une réponse inflammatoire qui submergera les capacités du système immunitaire du patient.

II. BRÛLURE ET SYSTÈME IMMUNITAIRE

Une brûlure grave entraîne de nombreux changements au sein de l'organisme. Une des réponses majeures consiste en une réaction inflammatoire qui, en réponse au dommage tissulaire, permet de mettre en jeu les mécanismes destinés à défendre l'organisme contre une éventuelle invasion pathogène au niveau de la plaie brûlée, en éradiquant ces agents pathogènes et en promouvant ensuite la réparation tissulaire. Cependant, si elle n'est pas contrôlée, elle perd ses fonctions bénéfiques et peut causer à son tour des dommages à l'organisme. (46) Cette phase d'inflammation marquée donne lieu à un état d'immunodéficience prononcé, qui affecte aussi bien l'immunité à médiation cellulaire qu'humorale. (21) Ce phénomène se caractérise entre autre par un appauvrissement du nombre de sous populations lymphocytaires et une diminution de l'habilité des macrophages et neutrophiles à détruire l'agent pathogène par le biais de la phagocytose. (47) Cette altération de la défense immunitaire va augmenter la susceptibilité de l'organisme aux infections, au développement d'un état de sepsis et dans le cas de complications additionnelles, peut mener à la défaillance viscérale multiple qui peut conduire au décès. (15)

L'activation d'une cascade de médiateurs pro-inflammatoires après une brûlure sévère constitue un facteur majeur dans le développement de la déficience immunitaire. (42) La plaie elle-même entre en jeu dans cette réaction inflammatoire et l'immunosuppression qui en découle. Les mécanismes menant à cet état de déficience ne sont pas encore complètement élucidés mais de nombreuses études ont déjà permis de mettre à jour bon nombre de composants de la réaction inflammatoire dans la voie qui mène à l'immunosuppression.

1. Immunosuppression

La réaction inflammatoire importante qui accompagne la réponse à une brûlure sévère résulte en une déficience de la fonction immunitaire et prédispose les patients aux infections. (15) L'étendue de la brûlure influence la magnitude de la dépression immunitaire. La complexité de cette réponse immunitaire et les nombreux facteurs physiologiques qui entrent en jeu dans la réponse de l'organisme à une brûlure laissent présumer que les mécanismes par lesquels la brûlure engendre ce phénomène d'immunosuppression sont multiples, et certains restent à être élucidés et compris. Une brûlure grave présente une telle amplitude que la sévérité de l'immunosuppression qui suit ce traumatisme apparaît être plus important que lorsque ce phénomène est observé suite à d'autres formes de traumatismes. (15) Cet état d'immunosuppression induit par la brûlure s'illustre notamment chez les patients par une période anormalement longue avant la rejection des allogreffes de peau vis-à-vis du délais pour les rejets de greffes de patients non brûlés. (21)

L'immunosuppression qui suit une brûlure serait reliée à une l'hyperactivité des macrophages ainsi qu'au développement d'un profile de cytokines issues des lymphocytes de types Th2 (lymphocytes T auxiliaires 2) aux fonctions immunosuppressives. Ceci est associé à une production accrue d'interleukine 4 (IL-4) et IL-10 tandis que la production de IL-2 est à l'inverse supprimée. (20) Le développement du profile de cytokines Th2 dans la réponse des cellules T de la rate dépend de la taille de la brûlure et des stimuli d'activation qui lui font suite. (20)

2. Sites de l'inflammation

L'immunité innée ou naturelle repose sur un ensemble de barrières de nature anatomiques, ainsi que physiologiques, phagocytaires et inflammatoires. La peau et les muqueuses représentent une première ligne de défense contre les pathogènes par le biais d'une barrière mécanique associée à un environnement à caractère acide qui contribue à

freiner la croissance microbienne. La perte ou l'altération de cette barrière de protection contribue à l'augmentation des risques d'infections et de complications suite à une brûlure. La brûlure grave et la réponse physiologique qui lui succède affectent différents sites de l'organisme en les rendant plus susceptibles aux infections en altérant leur physiologie et leur rôle de barrière protectrice. Ces sites deviennent donc acteurs dans l'induction du phénomène d'immunosuppression ou deviennent siège d'une réaction inflammatoire qui à son tour participe dans le développement de l'affaiblissement immunitaire.

2.1 La plaie

La surface brûlée joue un rôle primordial dans la réponse à une brûlure grave et est le centre de nombreux phénomènes physiologiques. La brûlure entraîne la perte de la barrière protectrice que constitue la peau et rend de ce fait l'organisme susceptible aux micro-organismes environnants. (21) Bien qu'elle soit stérile immédiatement après l'injure thermique, elle est rapidement colonisée par des organismes de type Gram positifs puis Gram négatifs (15). Cette destruction cutanée et l'infection qui peut en résulter induisent une réaction inflammatoire qui est susceptible de s'étendre à l'ensemble de l'organisme, et qui constituent un trouble majeur dans la gestion d'une brûlure grave. (48)

Une toxine issue du tissu brûlé serait immunosuppresseur. (15) Un complexe protéique induit par la chaleur est relâché dans la circulation et entraîne l'inhibition de la prolifération des cellules T normales. La plaie en elle-même représente donc un facteur induisant l'immunosuppression ce qui souligne d'autant plus l'importance de l'excision de l'escarre dans les soins apportés aux patients. La plaie agit en tant qu'organe (48) et interagit avec l'organisme conduisant à des modifications d'ordre systémiques, circulatoires et métaboliques. (15, 48) Le transfert de peau brûlée équivalente en taille à une brûlure de 20% TBSA chez une souris non brûlée résulte en une immunosuppression marquée. (49) De plus, les cloques qui peuvent se former selon la sévérité de la plaie sont déclencheurs de l'inflammation.

2.2 Intestin

Au même titre que la peau, la muqueuse intestinale occupe une fonction importante en tant que barrière de défense locale qui permet d'empêcher l'accès vers le reste de l'organisme aux bactéries et aux endotoxines contenues dans la lumière intestinale. (50) Hors la réponse physiologique à la brûlure qui entraîne des changements systémiques, dont la réduction significative du flot sanguin intestinal et une diminution conséquente de la perfusion et de l'oxygénation des tissus, affecte significativement la perméabilité micro vasculaire et l'intégrité de la muqueuse et permet aux bactéries et endotoxines de la traverser. (4, 51) Ceci explique pourquoi une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale est observée suivant une brûlure et lors d'épisodes infectieux. (52,53) Cette rupture de l'intégrité de la barrière permet le mouvement des bactéries et endotoxines à travers la membrane vers les tissus extérieurs, on qualifie ce phénomène de translocation bactérienne. (54, 55) L'altération de l'intégrité de la muqueuse intestinale jouerait un rôle dans le développement d'infections, voire de défaillance viscérale multiple pour certains patients. (56) Il existe une corrélation entre l'étendue de la brûlure et le degré de perméabilité de la membrane intestinale. (57) Un stress au niveau de l'intestin pourrait ainsi transformer celui-ci en organe pro-inflammatoire. (58)

La translocation bactérienne représente un enjeu d'autant plus grand quant à la santé du patient que les endotoxines circulantes qui en résultent peuvent promouvoir à leur tour une augmentation de la perméabilité intestinale. Elles induisent de même la libération de cytokines pro-inflammatoires. Ceci aboutit à un cercle vicieux qui peut altérer sévèrement les défenses de l'hôte et conduire à un endotoxémie généralisée. (84) De plus, l'immunosuppression qui suit la brûlure affecte la production d'immunoglobuline G par les lymphocytes B. IgG représente un puissant anticorps contre les invasions bactériennes de type Gram positif et négatif. L'affaiblissement de la production d'IgG couplée au phénomène de translocation bactérienne au niveau intestinal peut engendrer des cas sévères de sepsis. (84) Chez des rats présentant une immunité cellulaire altérée, la

muqueuse intestinale restée intacte empêche ou limite le phénomène de translocation bactérienne. (59) Ceci souligne d'autant plus l'importance de cette barrière dans son rôle de prévention contre le développement d'infections.

2.3 Poumons

À l'image de la muqueuse intestinale, les voies respiratoires font office de barrière protectrice prévenant l'accès d'agents pathogènes à l'organisme. Un patient brûlé qui a été victime également de blessures aux voies respiratoires par inhalation de fumée peut voir ses risques de mortalité doubler à cause de l'insulte affligée au système pulmonaire. (60) L'inhalation de fumée semblerait activer la libération de thromboxane, élément vasoconstricteur, qui causerait ainsi une augmentation de la pression au niveau de l'artère pulmonaire et jouerait un rôle dans la fonction compromise de cette barrière de défense. De plus, l'inhalation de fumée toxique cause un dommage immédiat à l'épithélium des voies respiratoires et altère de ce fait l'intégrité de la barrière de défense.

3. Les médiateurs de l'inflammation

La réaction inflammatoire et l'état d'immunosuppression suivants une brûlure sont orchestrés de manière complexe par plusieurs groupes de cellules et de médiateurs de l'inflammation. Une réponse inflammatoire est normalement contrôlée par une balance minutieuse d'agents pro-inflammatoires et anti-inflammatoires afin d'éradiquer les agents responsables du déclenchement de la réaction en prenant soin toutefois de ne pas endommager l'hôte. Cependant, un déséquilibre en faveur des médiateurs pro-inflammatoires peut donner lieu à des dommages tissulaires et un désordre physiologique menant à une défaillance des organes qui peut à son tour entraîner la mort. (61) Cette réaction excessive peut induire une dépression du système immunitaire qui est une cause majeure du développement d'infections. (62) Un vaste nombre de médiateurs est impliqué dans le développement et le contrôle de la réaction inflammatoire.

3.1 Les Macrophages

Composants de l'immunité naturelle, les macrophages participent à la défense de l'organisme en ingérant les microorganismes pathogènes (c'est la phagocytose) et en libérant certains dérivés actifs de l'oxygène ainsi que d'autres médiateurs de l'inflammation qui participent à la réponse immunitaire. Ils sont originaires des monocytes, eux même issus de cellules souches myéloïdes, qui circulent en permanence dans le flux sanguin. Lors d'une infection, sous l'action de signaux, ils pénètrent dans les tissus où ils vont se différencier en macrophages. Des signaux seront à nouveau nécessaires pour déclencher leur activation. Ils jouent un rôle important au sein de l'orchestration de la réponse immunitaire et de la réaction inflammatoire de par leur action d'activation ou d'inhibition de certains mécanismes de défense. Les fonctions effectrices des macrophages sont exprimées seulement après l'activation de ceux-ci par des stimuli. En cas d'une réponse altérée à ces stimuli, des altérations physiologiques peuvent en résulter.

C'est le cas dans la réponse inflammatoire après une brûlure, ce qui place ainsi les macrophages en tant que médiateurs majeurs dans l'élaboration de l'état d'immunosuppression. (1) La brûlure affecte la population des macrophages sur plusieurs aspects. Leur capacité à phagocyter diminue et donc ainsi que leur capacité de présentation d'antigènes. (21, 63) Ils semblent également présenter un phénotype d'hyperactivité qui se définit par l'augmentation de leur capacité à produire des médiateurs de l'inflammation (64-67) comprenant entre autres la prostaglandine E₂ (PGE₂) (1), le monoxyde d'azote (ou oxyde nitrique, NO), l'interleukine 6 (IL-6), IL-1 et TNF α , dont les fonctions seront expliquées plus loin. (1, 42) Des taux élevés de NO et de PGE₂ suivant une brûlure sont associés avec l'hyperactivité des macrophages. (1) Une fois activés, les macrophages libèrent ces cytokines dites « d'alarmes », IL-1 et TNF α . Ces dernières vont à leur tour stimuler les lymphocytes T et auront des fonctions connexes telles la production de protéines de la phase aiguë au niveau du foie avec la participation de IL-6, ou encore l'induction de fièvre via action sur le système nerveux central.

L'expression de cette hyperactivation serait en partie reliée à la taille de la brûlure. (20) Il semblerait que la brûlure active de manière directe ou indirecte les macrophages avant qu'ils n'aient reçu de stimuli, ce qui engendrerait cette réponse soutenue et altérée et la production massive de médiateurs de l'inflammation. (68-70)

En parallèle à leur hyperactivité, les macrophages sont des cellules présentatrices d'antigènes, c'est-à-dire qu'ils ont la capacité d'exprimer à leur surface des molécules d'origine antigénique, issues de la phagocytose d'organismes nuisibles. La présentation d'antigènes permet l'activation des lymphocytes T, entre autres, hors après un traumatisme important ou une chirurgie majeure, les macrophages voient leur capacité de présentation d'antigène diminuée. Ce phénomène serait un facteur qui contribuerait ainsi à l'affaiblissement de la réponse immunitaire et favoriserait les risques d'infections. (63)

3.2 NO et stress oxydatif

Le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO), est un vasodilatateur puissant et est nécessaire pour maintenir une microcirculation optimale au niveau du flux sanguin. (50) C'est un messager endogène trans-cellulaire vastement distribué au sein de l'organisme qui prend part à divers mécanismes d'action. (23) Le mécanisme par lequel les macrophages contribueraient au développement d'un affaiblissement immunitaire dépend de leur faculté à produire et sécréter du NO. (1) Les taux de nitrate, un produit de dégradation stable du NO, sont élevés après une brûlure et la suppression de la prolifération des lymphocytes T après la brûlure serait NO dépendante. (1)

Le NO est synthétisé à partir du groupe guanido de la L-arginine par les NO synthases. Les synthases endothéliale, eNOS, et neuronale, nNOS, sont les formes constitutives de l'enzyme (cNOS). Elles synthétisent NO en faible quantité mais à un taux suffisant pour son activité biologique de neurotransmission et de vasodilatation. (42) L'autre forme de l'enzyme en revanche, la forme inductible iNOS, produit des quantités de NO 1000 fois supérieures à celles de cNOS (42). Son expression est régulée par différentes cytokines

dont $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ (interféron γ) et $\text{IL-1}\beta$. L'activité de iNOS au sein des macrophages de la rate suite à une brûlure serait induite par un mécanisme dépendant de $\text{IFN-}\gamma$. L'utilisation d'anticorps anti- $\text{IFN-}\gamma$ permet de retrouver une prolifération normale des lymphocytes T et diminue la production de NO par les macrophages. (1)

L'augmentation de l'activité de iNOS menant à une production accrue de NO est impliquée dans la pathogenèse de troubles au niveau de l'intestin. Ces derniers entraînent une dysfonction de la barrière intestinale et permettent ainsi le phénomène de translocation bactérienne. (50) De grandes quantités de NO peuvent endommager la muqueuse intestinale selon plusieurs mécanismes. Le NO peut causer des dommages aux cellules de la muqueuse par action paracrine ou autocrine si elles sont exposées à de larges quantités du médiateur. Il peut aussi induire l'inhibition de la respiration cellulaire, affecter le flux sanguin régional et causer une mauvaise distribution de sang, et enfin augmenter la perméabilité de la muqueuse intestinale. (50)

Le stress oxydatif est induit par la libération de NO, la libération de produits issus de la peroxydation des lipides ainsi qu'un déséquilibre dans l'équilibre entre antioxydants et oxydants. Il pourrait être à l'origine de la réponse immunitaire altérée après la brûlure. De plus, un accroissement du stress oxydatif induit une réponse inflammatoire qui est associée à une immunosuppression prononcée et soutenue et la sévérité de cette immunosuppression est directement reliée à l'intensité du stress oxydatif. (13)

3.3 Les eicosanoïdes

Les eicosanoïdes sont des messagers chimiques synthétisés à partir de l'acide linoléique, l'acide arachidonique (AA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA). Ils comprennent entre autres les prostaglandines (PG), thromboxanes et leukotriènes (LT). La brûlure est associée à une hausse de la production d'eicosanoïdes qui représente un aspect critique pour la fonction immunitaire du patient. (42) Ils sont impliqués dans la réponse immunologique et ainsi dans l'induction de l'immunosuppression. Suite au traumatisme il y a augmentation de la production et libération de prostaglandines et de

leukotriènes par les macrophages, ce qui contribue à des taux plasmatiques accrus d'eicosanoïdes. (63) Les macrophages ont une capacité accrue de production de PG après une brûlure. (42) Des niveaux élevés de PGE_2 après la brûlure peuvent directement causer un affaiblissement de la réponse immunitaire et contribuer au phénomène d'immunosuppression par le biais de l'activation de iNOS dans les macrophages.

Les prostaglandines sont de puissants médiateurs immunosuppresseurs, elles se retrouvent dans presque tous les tissus et sont produites et libérées après stimulation. (42, 15) Leur biosynthèse est accrue dans les tissus après une brûlure et leur concentration dans les sécrétions de la plaie est nettement supérieure aux quantités normalement nécessaires à un effet biologique. (15) La cyclooxygénase (COX) est l'enzyme responsable de la synthèse de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Il existe deux isoformes de cette enzyme, la forme constitutive COX1 et la forme inducible COX2. (1) Cette dernière est exprimée en premier lieu dans les macrophages, monocytes, neutrophiles et cellules endothéliales. (42) COX2 entraîne la génération de hauts niveaux de PG qui vont médier l'inflammation ainsi que la sensation de douleur qui en découle et l'immunosuppression. Des inhibiteurs de COX peuvent restaurer divers aspects de la fonction immunitaire après une brûlure. (1) PGE_2 n'est en revanche qu'un élément dans l'induction de l'immunosuppression et non la seule cause puisque les inhibiteurs de COX ne rétablissent pas une fonction immunitaire normale. PGE_2 affecte l'activité des lymphocytes T au niveau de leur capacité de prolifération et de production d'IL-2. (1) Les mécanismes par lesquels ce médiateur affecte les lymphocytes T seraient attribués à la génération de taux élevés de AMP cyclique (Adénosine Monophosphate) (1) et à la suppression de l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II chez les cellules présentatrices d'antigène, affectant donc ainsi la réponse des lymphocytes T. (1) PGE_2 affecte aussi l'activité des cellules NK (cellules tueuses naturelles) et la production des cytokines de type Th1 (IL-2 et $IFN\gamma$). PGE_2 augmente la production de $TNF\alpha$ par les macrophages à très faible concentration et l'inhibe à haute concentration.

Il existe une relation entre PGE₂ et NO. Les inhibiteurs de iNOS peuvent bloquer la production de PGE₂ par les macrophages, et PGE₂ peut augmenter l'activité de iNOS en réponse à la stimulation par des cytokines. (1) La brûlure altère l'activité de iNOS des macrophages en réponse à PGE₂. (1)

Le thromboxane A₂ est produit localement par les plaquettes circulantes (4) et voit ainsi ses niveaux significativement augmenter dans les tissus touchés par la brûlure ainsi que dans les fluides contenus dans les cloques. (15) Ceci pourrait être à l'origine de la vasoconstriction et de l'ischémie locale observée dans les tissus brûlés. (15) Ce médiateur est à l'origine de dommages tissulaires. (4)

Les leukotriènes ont des effets sur la microcirculation, leurs rôles au sein de la réaction inflammatoire après une brûlure ne sont toutefois pas très bien connus. (15) De hautes concentrations de leukotriène B₄ (LTB₄) sont observées dans le plasma et les fluides contenus dans les cloques après une brûlure sévère. (21) LTB₄ induit l'augmentation de la production de TNF α , IL-1 et IL-6 par les monocytes et les macrophages.

L'acide arachidonique (AA) est le principal précurseur pour la biosynthèse des prostaglandines issues de la cyclooxygénase. La libération d'AA peut être stimulée directement ou indirectement par un certain nombre d'hormones ainsi que par des stimuli inflammatoires ou immunologiques, dont les radicaux libres d'oxygène. (15)

3.4 Les lymphocytes

Les lymphocytes, qui initient la réponse immunitaire acquise et sont responsables de la reconnaissance spécifique des pathogènes, sont originaires de la moelle osseuse. Ils vont y demeurer afin de compléter leur maturation dans le cas des lymphocytes B (L_B), ces derniers se différencient en cellules plasmiques qui produiront des anticorps, ou bien vont migrer vers le thymus où ils se développeront en lymphocytes T (L_T). Ils migrent par la suite vers les organes lymphoïdes secondaires comme la rate ou les ganglions où ils pourront recevoir les stimuli nécessaires à leur activation et l'élaboration

conséquence d'une réponse immunitaire. Les L_T sont à leur tour différenciés en sous-groupes qui exerceront des fonctions variées au sein de la réponse immunitaire. Les L_T sont des acteurs indispensables à la réponse immunitaire à médiation cellulaire. En réponse à une stimulation, les lymphocytes T sécrètent des cytokines destinées à promouvoir leur prolifération, leur différenciation, ainsi que l'activation d'autres types de cellules dont les cellules B, les cellules NK et les macrophages. On observe une diminution de la réponse des lymphocytes à la stimulation par des mitogènes après différents traumatismes comme la brûlure ou une chirurgie. (63) La suppression de la réponse proliférative des L_T ne se fait toutefois pas avant 4 jours. La suppression atteint un maximum vers 7 jours environ et persiste après 14 jours. (1)

Les lymphocytes T sont représentés par plusieurs sous-populations. Les L_T auxiliaires ou helper (Th) sont stimulés par des cellules présentatrices d'antigène comme les cellules dendritiques, qui peuvent interagir avec des L_T naïfs et permettent l'induction d'une réponse immunitaire spécifique aux cellules T, et des cellules B qui induisent leur production de cytokines. Les L_T cytotoxiques ont la capacité de reconnaître une cellule cible de l'hôte et de provoquer sa mort. Les L_T suppresseurs restent à être caractérisés. Une diminution du ratio de L_T auxiliaire/suppresseur est observée chez les brûlés. (21) Les lymphocytes T auxiliaires se catégorisent eux-mêmes en deux groupes selon les cytokines qu'ils sécrètent et de ce fait selon leur caractère pro et anti-inflammatoire.

Les Th1 produisent IL-2 et $IFN\gamma$ qui permettent l'activation des macrophages, des cellules NK, et des lymphocytes T. Ce sont les principaux effecteurs de l'immunité à médiation cellulaire. Des pathogènes intracellulaires peuvent induire l'activité de Th1. (71) Ils supportent l'activation des macrophages. Les Th2 libèrent IL-4 ainsi que IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 et IL-13. Des études impliquent les cytokines Th2 dans l'immunosuppression après une brûlure et dans le développement de sepsis. (42) Les Th2 sont impliqués dans l'immunité humorale et suppriment l'activation des macrophages. Des cytokines, IL-12 et $IFN\gamma$ puis IL-4, sont elles-mêmes à l'origine de la différenciation en Th1 ou Th2 respectivement. (71) Les cytokines Th1 sont plus sensibles à l'inhibition par PGE_2 que les cytokines Th2. (42) Les cytokines Th1 et Th2 se régulent négativement

vis-à-vis de leur production : les cytokines issues de Th1, principalement $\text{IFN}\gamma$, inhibent la différenciation des cellules Th2 tandis que les cytokines issues de ces dernières, surtout IL-4, inhibent la différenciation des cellules Th1. L'inhibition de la réponse de Th1 par PGE_2 pourrait induire une réponse accrue immunosuppressive venant de Th2. (42) Les macrophages supportent l'expression différentielle des cellules Th1 ou Th2 via la production des cytokines IL-12 ou IL-10.

Les lymphocytes se différencient également de par les marqueurs qu'ils expriment en surface. Les L_T auxiliaires possèdent à leur surface les marqueurs de type CD4^+ tandis que les T cytotoxiques possèdent le type CD8^+ . Les T suppresseurs peuvent être de type CD4^+ ou CD8^+ . On observe une diminution des sous-populations de lymphocytes, touchant principalement les cellules de type CD4 lors des premières 48h puis de type CD8 au cours des 3 semaines qui suivent un traumatisme. (15) L'estimation du ratio de lymphocytes $\text{CD4}/\text{CD8}$ constitue un indicateur dans l'issue du patient. (93 – 96)

Les cellules tueuses NK représentent une classe de lymphocytes dépourvus de récepteurs aux cellules T et B. Une majorité exprime les marqueurs de surface CD16 et CD56. Ces cellules cytotoxiques sont destinées à lyser des tumeurs ou cellules infectées par un virus. Elles jouent un rôle dans la rejection des greffes et sont activées par IL-2, IL-12, $\text{IFN}\gamma$ et $\text{TNF}\alpha$.

3.5 Les Cytokines

Médiateurs issus de leucocytes activés, les cytokines sont des protéines ou peptides produits par une variété de types cellulaires. Elles permettent la transmission de signaux intercellulaires qui vont moduler la réponse inflammatoire succédant à un traumatisme. (15) Elles peuvent être bénéfiques et contribuer à la résistance de l'organisme face à une agression ou au contraire avoir un effet délétère en affectant le fonctionnement d'organes et en induisant une réaction inflammatoire systémique. (15) L'immunodéficience qui suit une brûlure ou un traumatisme majeur est associée avec une

augmentation de la concentration de cytokines au sein de l'organisme. (63) Cet accroissement est proportionnel à l'étendue de la brûlure. (23) Les cytokines agissent comme régulateurs de l'amplitude et de la durée de la réaction inflammatoire ainsi que de la résistance aux infections. (15)

3.5.1 Les cytokines pro et anti-inflammatoires

La production de cytokines pro-inflammatoires constitue un avantage dans le système de défense de l'organisme. Mais une concentration trop importante de cytokines circulantes peut être nuisible et est associée à une mauvaise issue. (22) Il existe une association entre les niveaux plasmatiques de cytokines pro-inflammatoires et l'augmentation de complications infectieuses ainsi que de la mortalité. (63) La libération de cytokines pro-inflammatoires est un important mécanisme par lequel les macrophages régulent la réponse inflammatoire. Ils sont une source prédominante de $\text{TNF}\alpha$, IL-1 et IL-6. (42) La phase aiguë est médiée en partie par ces cytokines. (42)

IL-1 existe sous forme de deux polypeptides, IL-1 α et IL-1 β , qui induisent des réactions variées lors de la phase aiguë. (15) Après une brûlure, une circulation accrue de IL-1 et de IL-1RA, l'antagoniste du récepteur à IL-1, est observée. Les concentrations sont élevées lors de l'admission du patient et décroissent avec le temps. (15) IL-1RA entraîne l'inhibition de la réponse inflammatoire induite par IL-1 ainsi que la prolifération des lymphocytes T. (15) Les lymphocytes stimulés par IL-1 libèrent des facteurs de croissance qui activent d'autres lymphocytes et promeuvent leur expansion. (72) IL-1 joue un rôle dans l'immunosuppression qui suit une brûlure en stimulant la production de prostaglandines et de NO. (72)

IL-6 peut agir sur la plupart des cellules et est produit par une variété de cellules qui comprend les lymphocytes T et B, les macrophages fibroblastes et les cellules endothéliales. (15) Cette cytokine est importante dans la maturation des cellules B et la régulation de l'activation des lymphocytes T, de même que l'induction des protéines de la phase aiguë lors d'une réaction inflammatoire. (42) Au foie, elle va stimuler la

production de protéines de la phase aiguë (15). Une augmentation d'IL-6 dans la circulation est observée chez les grands brûlés notamment en cas de sepsis. (15) Toutefois si une présence accrue de IL-6 dans le fluide des cloques est associée à la guérison de la plaie (15), une élévation marquée d'IL-6 est corrélée à la suppression de l'immunité à médiation cellulaire et d'un accroissement de la mortalité. (42) Sa concentration est significativement élevée chez les patients qui sont décédés des suites de leurs brûlures comparé aux patients ayant survécus. (4)

Le facteur de nécrose tumoral ou TNF α est issu des macrophages activés. Il permet entre autres de réguler la production d'autres cytokines. (15) Des taux élevés de TNF α après une brûlure sont associés avec un pauvre pronostic quant à l'issue du patient. (15) La concentration plasmatique de TNF α est élevée après une brûlure sévère, elle est aussi corrélée avec le taux de mortalité chez des patients critiques. (21) Il jouerait un rôle important dans le développement de la défaillance viscérale multiple après une brûlure. (15) Une brûlure dépourvue d'état de sepsis ne cause pas, ou une très faible, augmentation du taux de TNF α circulant et ces faibles taux seraient bénéfiques aux patients en induisant l'activation des mécanismes de défense et diminuant ainsi les risques d'infections. (42) L'excision du tissu brûlé permet de normaliser la production de TNF α par les macrophages. (42)

IL-12 est une cytokine produite par les cellules présentatrices d'antigènes tels que les macrophages et les monocytes. Elle possède des propriétés immunomodulatrices puissantes comme l'induction de la production de IFN γ par les lymphocytes T et les cellules NK qui va contribuer à une réponse de type Th1 et permettre de supporter l'immunité à médiation cellulaire. (42) Elle peut agir en tant que cytokine pro-inflammatoire et en tant qu'élément immunomodulateur qui associe les réponses innée et acquise. Après une brûlure on dénote une production déficiente de IL-12 (42), et les traitements incluant l'utilisation de cette cytokine parviendraient à augmenter les chances de survie du patient. (1) La production de IL-12 est inhibée par le médiateur de l'inflammation PGE $_2$. (1) Il existerait une relation entre une faible ou absente production de IL-12 et l'activité accrue de COX2 au sein des macrophages. L'inhibition de COX2

permet de retrouver une production normale de IL-12 après stimulation in vitro avec LPS (lipopolysaccharide). (1) D'autres études stipulent que IL-4, originaire des cellules Th2, serait à l'origine de la suppression de la production de IL-12. Hors PGE₂ joue un rôle au niveau de la régulation des cytokines de type Th2, donc les deux mécanismes restent probables. (1)

IL-2 est produite et libérée par les lymphocytes T. Cette cytokine peut agir sur tous les types de lymphocytes T ainsi que sur les macrophages et représente l'activateur le plus puissant. (15) Des niveaux élevés de IL-2 et de récepteur à IL-2 après une brûlure indiquent l'activation du système lymphoïde. (15) L'immunosuppression qui fait suite à une brûlure se caractérise entre autres par une diminution de IL-2. (15)

IL-10 est produite par les lymphocytes T de type Th2 ainsi que les macrophages. Elle peut bloquer l'expression de iNOS et la production de TNF α . (42)

L'interféron γ possède de nombreuses actions immunorégulatrices dont l'induction de l'activité des macrophages pour lesquels c'est le plus puissant. (15) La production d'IFN- γ chez les souris brûlées est supprimée entre 2 à 7 jours après une brûlure. (15) Le taux d'IFN- γ circulant est pratiquement indétectable après une brûlure puis augmente vers le 5^{ème} jour, avec un pic autour du 10^{ème} jour, suivi d'un déclin. (14)

3.6 Radicaux libres d'oxygène

La formation de radicaux libres, molécules qui se retrouvent avec un électron non apparié dans une orbite extérieure, sont des composés hautement réactifs et causent des dommages aux cellules. (15) Une majorité des radicaux formés in vivo sont des intermédiaires dans le processus de réduction de l'oxygène en eau. (15) Les macrophages et les neutrophiles réduisent l'oxygène O₂ en anion superoxyde O₂⁻ lorsqu'ils sont stimulés au cours de la phagocytose. Ces radicaux libres de l'oxygène joueraient un rôle dans les dommages subits par les organes après une brûlure notamment

les dommages aux poumons, et contribueraient ainsi à la défaillance viscérale multiple. (15) Une formation accrue et soutenue de superoxyde est observée après une brûlure. (21)

4. Conséquences sur l'organisme

La réponse inflammatoire, la surproduction de médiateurs de l'inflammation et l'altération du niveau de cytokines circulantes qu'elle engendre, contribuent à des effets néfastes sur l'organisme. Le principal problème après une brûlure est le phénomène d'immunosuppression qui représente un risque accru d'épisodes infectieux pour le patient. Les effets systémiques à surveiller incluent également le syndrome de réponse inflammatoire systémique (15), le syndrome de dysfonctionnement viscérale multiple, qui peut évoluer vers la défaillance multiple des organes et conduire au décès, et le syndrome de détresse respiratoire adulte. (15)

Un traumatisme sévère comme une brûlure, qui est d'autant plus souvent accompagnée de chirurgies afin de maîtriser les dommages causés par la blessure, induit une réponse inflammatoire marquée qui va activer nombre de médiateurs pro-inflammatoires puis anti-inflammatoires afin de contrôler la réaction. Cette activation aboutit à une paralysie du système immunitaire qui peut mener à des épisodes infectieux, des cas de sepsis, de défaillance viscérale multiple et ultimement à la mort en cas de dommages trop importants. (19)

III. SUPPORT NUTRITIONNEL

Il est maintenant communément reconnu et vastement étudié que l'alimentation joue un rôle primordial sur la santé comme en témoigne l'engouement pour les produits biologiques ou la popularité des acides gras polyinsaturés n-3. Les nutriments apportés par la diète quotidienne joue en effet un rôle important au niveau de la régulation du système immunitaire. Leur action peut se faire à différents niveaux, directement au niveau du tractus intestinal, au niveau des organes lymphoïdes ou encore directement au niveau des cellules immunitaires et de leur activité. (73, 74)

Le support nutritionnel a pour but d'inverser les altérations immunologiques qui menacent la santé de l'hôte et de promouvoir le fonctionnement du système immunitaire afin d'améliorer la situation du grand brûlé. Par exemple, l'immunité cellulaire et humorale est supprimée en cas de pauvre nutrition, tandis qu'un support nutritionnel approprié va être bénéfique sur l'organisme et ainsi permettre de minimiser la réponse hypermétabolique ainsi que l'incidence de sepsis. (4, 21).

1. Besoins énergétiques

1.1 Hypermétabolisme

L'incidence de la morbidité et mortalité des patients brûlés pourrait être connecté à cet hypermétabolisme et les délais de guérison de la plaie qu'il engendre, de même que les risques d'infection qui y sont associés. Le support nutritionnel et les stratégies pour contrôler le catabolisme excessif de l'organisme représentent un point d'intérêt majeur dans les soins administrés aux grands brûlés. Parmi les conséquences néfastes que pourraient induire l'hypermétabolisme, et qui illustre donc l'intérêt majeur d'une thérapie nutritionnelle dans la gestion des grands brûlés, on compte la malnutrition protéique. Cette dernière altère les défenses immunitaires et antibactériennes de l'individu et mène à

un dérangement de l'écologie de la microflore intestinale, conduisant à une atrophie de la muqueuse. (50) L'immunité cellulaire est la plus affectée en cas de malnutrition protéique. (75) La structure et la fonction du thymus peuvent être altérées et compromettre la réponse mémoire des lymphocytes T et également jouer un rôle éventuel dans le développement de l'immunosuppression après une brûlure. (75) La malnutrition combinée aux infections affaiblissent la réponse immunitaire et contribuent à l'augmentation des taux de médiateurs de l'inflammation. (75)

1.2 Évaluation de la dépense énergétique

La dépense énergétique engendrée par l'état d'hypermétabolisme peut être évaluée par le biais de différentes méthodes. Avec la calorimétrie directe on mesure la chaleur dégagée par les oxydations au sein de l'organisme. La calorimétrie indirecte en échange permet de mesurer la consommation d'O₂, et éventuellement du CO₂ expiré, pour mesurer cette chaleur dégagée. (76) Il est aussi possible d'estimer ces besoins avec l'aide de formules adaptées à la condition des grands brûlés. La plus utilisée est celle de Curreri qui prend en compte l'étendue de la brûlure du patient (77) :

$$\text{Besoins énergétiques} = (25 \text{ Kcal/Kg}) + (40 \text{ Kcal} \times \% \text{TBSA})$$

1.3 Voies d'administration

La route par laquelle les patients sont nourris peut influencer les réponses inflammatoire et métabolique qui découlent d'une brûlure grave, influençant de ce fait l'incidence de complications infectieuses et l'issue clinique. (50) Ainsi une alimentation entérale à haute teneur en protéines permet une meilleure issue clinique chez les patients. (50) Les altérations des défenses immunitaires sont amoindries ainsi que l'incidence de complications infectieuses ce qui a pour effet d'accroître le taux de survie. La nutrition par voie entérale représente un avantage en permettant le support de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la muqueuse intestinale. Elle permet de maintenir une masse de la

muqueuse adéquate en stimulant notamment la croissance et la prolifération des cellules épithéliales de la barrière. (50) Cette voie d'alimentation préserve beaucoup mieux la fonction de barrière intestinale que la nutrition par voie parentérale.

2. Acides Gras

La composition en acides gras des cellules immunitaires a un effet régulateur sur la réponse immunitaire. (75) Ceci s'observe par exemple chez des individus obèses qui, après une perte de poids, présentent une amélioration de la fonction immunitaire *in vitro* et une diminution des infections. (75)

2.1 Influence des acides gras sur le système immunitaire

Les mécanismes d'action des acides gras sur le système immunitaire restent à être plus clairement élaborés, toutefois il existe de nombreuses hypothèses quant à la relation entre les acides gras apportés par l'alimentation et le fonctionnement du système immunitaire.

Les acides gras pourraient influencer l'expression génique en se liant, et ainsi activant, à des récepteurs nucléaires caractérisés comme les récepteurs peroxisomes proliférateurs activés (*Peroxisomal proliferator-activated receptors*). (78) Ces récepteurs agissent en tant que facteurs de transcription et sont exprimés entre autres dans les lymphocytes T et B. Leur rôle au sein de la modulation de la réponse inflammatoire par les acides gras reste flou, mais ils constitueraient un mécanisme d'action potentiel par lequel les acides gras de l'alimentation agiraient sur le système immunitaire.

Le bon fonctionnement du système immunitaire repose en grande partie sur la communication précise entre les cellules qui le constituent, afin d'assurer une fonction optimale. Un dommage dans les systèmes de signalisation peut résulter en une réponse défectueuse. (43) Dans ce sens, les acides gras de la diète pourraient jouer un rôle quant à

la structure des membranes des cellules immunitaires et donc ultimement affecter les interactions cellules-cellules.

2.1.1 Synthèse des éicosanoïdes

Une des relations directes entre les acides gras alimentaires et le système immunitaire réside dans la synthèse de ces composés de l'inflammation. Les acides gras précurseurs de la synthèse des éicosanoïdes sont libérés des phospholipides de la membrane cellulaire, en général sous l'action de la phospholipidase A_2 en réponse à l'activation par un stimulus cellulaire. Ils permettent de ce fait la formation de composés immunosuppresseurs comme PGE_2 sous l'action de la cyclooxygénase. (71) De manière générale, les cellules inflammatoires humaines contiennent une proportion supérieure d'acide arachidonique (AA) et de plus faibles concentrations d'acides gras n-3 comme l'acide linoléique et l'acide eicopentaénoïque, ce qui rend l'AA un précurseur principal des éicosanoïdes. L'administration d'huiles de poissons joue un rôle au niveau immunitaire en induisant un débalancement de la fraction d'acide arachidonique au profit d'une fraction plus élevée de lipides polyinsaturés n-3, ce qui a pour effet de diminuer la production des médiateurs issus de l'AA. (79) Toutefois contrairement à ce à quoi l'on aurait pu s'attendre, le type d'acide gras dans la diète n'influence pas la prolifération des splénocytes ou le stress oxydatif après une brûlure grave. L'importance des acides gras résiderait dans la quantité administrée et non leur nature. (34)

2.1.2 Synthèse des acides gras

Les acides gras représentent les principaux constituants des membranes cellulaires, et jouent de ce fait un rôle important quant au maintien de l'intégrité des cellules et à leur faculté d'interaction et donc leur fonction. Les mammifères ont la faculté de synthétiser une certaine fraction des acides gras mais sont en revanche incapables de synthétiser certains acides gras polyinsaturés. L'organisme nécessite donc un apport extérieur des ces composés, que l'on qualifie d'acides gras essentiels. On

compte parmi ceux-ci l'acide linoléique et l'acide α -linoléique. Ces acides gras permettront de servir de précurseurs dans la synthèse de composés lipidiques.

2.2 Le type d'acides gras

2.2.1 Acides gras polyinsaturés

Les acides gras polyinsaturés n-3 (n-3 PUFA) à longue chaîne ont une influence sur la fonction des cellules immunitaires et de ce fait l'inflammation. Leur administration contribue à la diminution des complications infectieuses et la longueur du temps d'hospitalisation. (22) Les n-3 PUFA sont les acides gras les plus puissants en termes d'activités immunomodulatrices. Parmi eux, les acides eicopentaénoïque (EPA) (20:5) et docohexaénoïque (DHA) (22:6), qui se retrouvent communément des les huiles de poissons. La consommation de ces huiles induit une diminution de la production de PGE₂ et ces huiles sont qualifiées de ce fait comme anti-inflammatoires. Les n-3 PUFA inhibent l'expression du CMH II à la surface des macrophages/monocytes induit par les cytokines (71) et entraînent ainsi une diminution de la capacité des monocytes à présenter un antigène aux lymphocytes.

In vitro, ces acides gras inhibent la production de IL-1 β , TNF- α , IL-6 et IL-12 ainsi que la prolifération des lymphocytes et l'activité des cellules NK. (71) Les huiles de poissons alimentaires entraînent une baisse de l'expression des récepteurs à IFN- γ à la surface des macrophages et des splénocytes murins. Chez les rongeurs également, elles vont contribuer à la diminution de la production de TNF- α , IL-1 β et IL-6 par les monocytes et macrophages lors d'une inflammation. (71) Les huiles de poissons riches en acides gras polyinsaturés contribueraient donc à affaiblir l'immunité cellulaire en diminuant les capacités des cellules présentatrices d'antigènes ainsi que la sensibilité des macrophages aux cytokines produites par les lymphocytes T. (71) Leur mécanisme d'action réside également dans le fait que ces huiles induisent une augmentation des quantités de EPA et DHA dans les membranes cellulaires impliquées dans la réaction inflammatoire, comme

les monocytes, les macrophages ou les lymphocytes. (71) En parallèle il y a diminution du contenu en AA des membranes cellulaires, ce qui résulte en une diminution des substrats disponibles pour la synthèse d'éicosanoïdes issus de l'AA, et donc une réduction de la synthèse de médiateurs inflammatoires. L'EPA entre en compétition avec l'AA et inhibe son métabolisme. (71)

L'acide linoléique (20:3 n-6) peut également induire l'inhibition partielle de la prolifération lymphocytaire si présent en quantités suffisantes. Il affecte aussi la production de IL-2, l'activité des cellules T et NK. (71) Son impact sur les fonctions immunitaires demeure toutefois limité.

L'acide γ -linoléique (AGL) ainsi que l'acide di-homo- γ -linoléique (ADGL) peuvent inhiber la prolifération des lymphocytes. (71) ADGL induit une baisse de leur production d'IL-2 et, combiné à AGL, inhibe la production par les monocytes d'IL-1 β et de TNF- α . (71) Chez le rat, AGL induit une baisse de la prolifération des lymphocytes couplée à une diminution de l'activité des cellules NK et de l'expression des récepteurs à IL-2 à la surface des lymphocytes. (71) Tandis que chez l'humain, des huiles riches en AGL provoquent une diminution de la production de TNF- α , de IL-1 et IL-6 par les monocytes et de la prolifération des lymphocytes. L'acide α -linoléique inhibe la prolifération des lymphocytes ainsi que la production de IL-2 et diminue l'activité des cellules T et des cellules NK. (71)

L'acide arachidonique induit une production accrue de IL-1 β par des monocytes humains mis en cultures. (71) Il inhibe la prolifération de lymphocytes mis en culture et induit la diminution de la production de IL-2. Toutefois, des études démontrent que nourrir des rats ou des souris avec une diète riche en AA n'affecte pas la prolifération des lymphocytes issus de la rate, ainsi que la production de IL-2 et l'activité des cellules NK. Pourtant l'apport soutenu d'AA accroît la capacité des cellules à produire PGE₂. (71) Une consommation importante de AA chez des rongeurs n'aurait donc pas une influence marquée sur l'immunité à médiation cellulaire.

2.2.2 Acides gras monoinsaturés

L'acide oléique est un acide gras monoinsaturé qui, en quantité suffisamment importante, aurait des fonctions immunomodulatrices. Il pourrait déclencher une inhibition partielle de la prolifération des lymphocytes ainsi que la production de cytokine IL-2 et de son récepteur, et de l'activité des cellules NK. (71)

Les acides gras insaturés, particulièrement ceux issus des huiles de poissons, sembleraient pouvoir être avantageux lors de la réaction qui suit une brûlure grave. Hors, lors d'une étude au sein de notre laboratoire (55), l'administration d'une diète faible en gras avec ou sans huiles de poissons n'a pas donné lieu à des différences significatives entre les deux solutions. La modulation de la réponse immunitaire par les acides gras après une brûlure serait reliée à la quantité apportée à la diète et non au type d'acide gras en tant que tel.

2.3 La quantité d'acides gras

Une diète à haute teneur en gras induit une diminution de la fonction lymphocytaire lorsque comparée avec l'administration d'une diète à faible teneur en gras chez des souris brûlées. (8) Les effets dépendent du taux précis de gras contenus dans la source alimentaire. Chez les humains, la baisse de consommation de gras augmente la prolifération des lymphocytes sanguins en réponse à la stimulation par le mitogène ConA (*Concanavalin A*). (71) La diminution de la quantité de gras contenus dans une diète induit une augmentation de la réponse des lymphocytes. L'apport d'acides gras essentiels reste toutefois nécessaire pour supporter le développement des organes lymphoïdes ainsi que la réponse des lymphocytes. (71)

Notre laboratoire a précédemment étudié la question de la quantité totale d'acides gras contenus dans la diète et de son effet sur l'immunosuppression suivant une brûlure grave. Lors d'un essai clinique randomisé à double insu, 43 patients présentant une brûlure supérieure à 20% TBSA furent assignés au sein de 3 groupes associés à une diète

différente. Un groupe contrôle recevant une diète avec 35% des calories sous forme de gras, un groupe recevant une solution faible en gras (15%), et un groupe recevant une diète faible en gras avec de l'huile de poissons, et ce pour une durée de 30 jours. Les patients à qui il fût administré une diète faible en gras, avec ou sans huiles de poissons, présentèrent une incidence moindre de cas de pneumonie, un meilleur statut nutritionnel et respiratoire, ainsi qu'une durée de guérison au niveau de la plaie brûlée raccourcie.

Les conclusions tirées de cette étude furent donc qu'un support nutritionnel avec une quantité totale de lipide réduite permettait de réduire la morbidité infectieuse et, en promouvant la guérison des plaies, réduire la durée totale d'hospitalisation. (28)

Une autre étude au sein de notre laboratoire, et à laquelle ce projet actuel fait suite, consistait à étudier l'effet de diètes comprenant une quantité de lipides plus ou moins importante, sur les fonctions immunitaires suite à une brûlure. À cette fin, des souris furent réparties aléatoirement au sein de 3 groupes auxquels était assignée une diète différant quant à leur quantité totale de lipides. Une diète contrôle à 5% de gras (11% des calories totales), une diète faible en gras à 1% (2% de l'apport calorique total) et une diète à haute teneur en gras à 25% (soit 45% de l'apport calorique total). Les splénocytes des souris ayant reçu la diète faible en lipides présentèrent une réponse proliférative normale après la stimulation *in vitro* par des mitogènes, et le stress oxydatif induit par la brûlure s'avéra être diminué par l'administration d'une diète plus faible en lipides.

L'impact de la quantité de gras sur l'immunosuppression après une brûlure avait été précédemment étudié au sein de notre laboratoire. Au cours de notre étude, nous avons repris cette hypothèse en ajoutant à notre protocole un paramètre de cinétique dans le but de confirmer les effets de la diète faible et gras et de pouvoir déceler, suivant la période requise pour son action sur le système immunitaire, un potentiel mécanisme et lieu d'action.

III. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Toutes les procédures impliquant le recours à un modèle animal effectuées pour les besoins de ce projet furent approuvées au préalable par le Comité institutionnel de protection des animaux.

Animaux

Les projets furent réalisés avec des souris de souche C3H/HeN âgées d'environ 6 à 8 semaines dont le poids oscillait autour de 20g. Les animaux, hébergés dans une animalerie sous un contrôle stricte de la température et de l'humidité et respectant un cycle de 12h de jour et 12h de nuit, furent acclimatés à leur nouvel environnement pendant une semaine avant le début de l'expérience. Les souris, placées au nombre de 5 par cage au cours de leur période d'acclimatation, recevaient une diète standard (Teklad 2018) contenant 5% de gras.

Le jour de la brûlure les animaux furent répartis aléatoirement en 10 groupes. Deux groupes contrôles recevant l'un la diète standard de l'animalerie et le second recevant la diète faible en gras pendant les 10 jours de l'expérience; un groupe contrôle de souris brûlées recevant la diète standard et 7 groupes recevant la diète faible en gras pour une période croissante allant de 4 à 10 jours.

Préparation des souris

Chaque souris, indépendamment de son groupe, fût en premier lieu pesée puis anesthésiée afin d'être préparée en vue de la brûlure ou bien de la brûlure simulée.

Au cours des premières expériences nous avons eu recours à l'utilisation d'une solution anesthésique de Kétamine combinée à de la Xylazine administrée par voie intra péritonéale (ip). Ayant observé une mortalité fréquente des animaux suite à l'utilisation de cette méthode nous l'avons substituée par la suite par une anesthésie à l'isoflurane, administrée aux animaux par voie respiratoire à l'aide d'un tuyau tenu au dessus de leur museau en continu jusqu'à ce que la brûlure ait été effectuée. Une fois les souris

endormies, la partie supérieure de la cage thoracique située entre les deux pattes antérieures, ainsi que toute la surface dorsale, de la nuque au haut de la queue, furent rasées.

Pompes Alzet

Afin de contrôler la douleur des animaux soumis à une brûlure, de la buprénorphine (Reckitt and Coleman Pharmaceuticals, Richmond, VA) leur fût administrée en continue par l'entremise d'une pompe micro osmotique (Alza, Palo Alto, CA). L'analgésique étant délivré en continu à raison de 0,1 mg/kg/12h et ce au cours des 10 jours que dura l'expérience. Soit pour une souris de 20g, un taux équivalent à 2,0 µg/12h. Les pompes furent insérées sous cutanée, puis l'incision refermée à l'aide de points chirurgicaux.

Brûlure

Une fois la pompe insérée, les souris furent à nouveau soumises à un test de douleur puis leur dos humidifié avant d'être insérées sur le dos dans un moule permettant de laisser une surface équivalente à une brûlure de 20% de la surface totale corporelle. Dans le cas des souris anesthésiées par injection intra-péritonéale, l'administration d'isoflurane par voie respiratoire fût également utilisée lors de la brûlure afin de s'assurer que l'animal ne pourrait ressentir la douleur infligée par la brûlure, et ce dans le cas uniquement des souris soumise à une véritable brûlure. Les souris appartenant aux groupes des « brûlées » eurent leur surface dorsale baignée dans de l'eau à 90°C pendant une période de 8 secondes, tandis que les souris appartenant aux groupes des « contrôles non brûlées » subirent le même traitement mais avec de l'eau à température pièce.

Ressuscitation et soins post-brûlure

Les souris, tous groupes confondus, furent ensuite ressuscitées par injection intra-péritonéale de 2,5 mL de solution saline suivie de l'application de Flamazine, un agent

antibactérien topique, sur la surface brûlée. Les animaux furent placés dans leur cage respective suivant leur groupe, cages préalablement placées sur des tapis chauffants à 37°C, et recouvertes d'un linge jusqu'à ce que leur réveil complet soit observé. Une fois l'état des souris vérifié, les linges furent ôtés, la nourriture pesée puis les cages replacées dans la pièce prévue à cet effet. Les souris contrôles demeurèrent au nombre de 5 animaux par cage tandis que les souris ayant reçues une brûlure furent placés au nombre de 2 ou 3 par cage.

Diètes

Les souris des groupes visant à tester l'effet de la diète faible en gras reçurent une diète à 1% de gras (TestDiet, 57NQ) à partir du jour 0 de l'expérience puis pour des périodes croissantes selon leur groupe. Après la période déterminée par leur groupe, elles reçurent à nouveau la diète de l'animalerie à 5% de gras pour le reste de l'expérience (Teklad 2018). Les souris appartenant aux groupes destinés à recevoir la diète standard demeurèrent avec cette diète depuis leur arrivée à l'animalerie jusqu'au sacrifice.

Soins administrés au cours des 10 jours de l'expérience

Chaque jour le poids des souris ainsi que celui de la nourriture de chaque cage furent pris en note, les plaies et points chirurgicaux des souris brûlées contrôlés (les points refaits si ouverts), et de la Flamazine appliquée sur la surface dorsale brûlée.

Sacrifice

Après avoir pesé la nourriture ainsi que les souris, ces dernières furent sacrifiées par inhalation de CO₂ suivie de dislocation des vertèbres à la base du cou. Leur rate fût ensuite prélevée et immédiatement déposée dans des pétris contenant 5 mL de *Hank's Buffered Salt Solution* (HBSS, Gibco) complémenté d'antibiotiques (100 UI/mL pénicilline, 100µg/mL streptomycine).

Préparation des splénocytes

Les rates furent triturées à l'aide du bout d'un piston de seringue puis transférées dans un tube de 15mL via une pipette pasteur contenant un peu de nylon afin de retenir les plus gros débris. Le pétri fût ensuite rincé à l'aide de 5mL de HBSS et le tout transféré dans le tube pour un volume total de 10mL. Les tubes demeurèrent sur glace tout au long de la préparation des cellules. Les tubes furent ensuite centrifugés afin de recueillir les splénocytes pour une durée de 10 minutes à 1000 rpm et ce à une température de 4°C.

Une fois la centrifugation terminée, le milieu fût vidé, les cellules décollées puis 10mL de Gey's solution avec NH_4Cl ajouté. Les tubes sont centrifugés à nouveau en maintenant les mêmes paramètres. Ces derniers resteront identiques pour chaque centrifugation mentionnée. Le milieu est vidé à nouveau et l'on procède à 3 lavages successifs au HBSS (10mL). Après le dernier lavage, le surnageant est vidé et le culot de cellule resuspendu dans du RPMI (Gibco), non supplémenté de glutamine, auquel ont été préalablement ajouté une solution d'antibiotique (Pénicilline Streptomycine, Gibco) et 50 μM de mercaptoéthanol, pour atteindre un volume final total de 10mL. Les cellules sont ensuite comptées par la méthode d'exclusion au Trypan Blue et les dilutions nécessaires sont effectuées afin d'obtenir une concentration finale de $2,22 \times 10^5$ cellules dans chaque puits.

Stimulation par mitogènes

Après avoir identifié des plaques de 96 puits à fond plat, un volume de 90 μL de chaque préparation cellulaire est déposé dans chaque puits en triplicata, suivi de 100 μL par puits de RPMI auquel la glutamine (2mM, Sigma) et 10% de sérum fœtal bovin (FBS) ont été ajoutés. Un volume additionnel de 10 μL est ajouté dans le cas du H57 pour obtenir un volume final de 200 μL .

Au cours de ce projet nous avons utilisé 3 sortes de mitogènes pour stimuler la prolifération des splénocytes. Le lipopolysaccharide (LPS; Sigma), spécifique aux cellules B; La Concanavalin-A (ConA; Sigma), un mitogène polyclonal stimulant les cellules T; et H-57, un anticorps anti-récepteur des cellules T murines (Cedarlane). Dans le cas des plaques destinées à la stimulation par H57, 200µL de la solution à 1µg/mL est versée au préalable la veille de l'expérience dans chaque puits et les plaques sont conservées à 4°C durant la nuit. Le jour de l'expérience, les plaques sont rincées à 3 reprises avec un volume de 200µL de *Phosphate-Buffered Saline* (PBS). 10µL de LPS ou de ConA sont ajoutés dans chaque puits pour avoir une concentration finale respective de 50µg/mL et 1µg/mL dans chaque puits. Les splénocytes sont par la suite incubés pour une période de 66 heures à 37°C dans une atmosphère humide avec un taux de 5% de CO₂. Après cette période d'incubation, 50µL du surnageant contenu dans chaque puits est prélevé puis déposé dans des plaques identifiées afin de procéder à la mesure du NO. On ajoute de la [H³]-thymidine (52 Ci/mmol; Amersham Canada, Oakville, ON, Canada) au volume restant dans les plaques à raison de 0,05 µCi/µL puis ces dernières sont remises dans l'incubateur pour une période de 8 heures.

Les cellules sont ensuite récoltées sur des filtres, lavées et séchées dans un Skatron Cell Harvester (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA). L'incorporation de [H³]-thymidine est ensuite mesurée par scintillation liquide (en comptes par minute, cpm).

Mesure du NO

La quantité de NO fût déterminée par colorimétrie pour détecter les niveaux de nitrite, un produit stable de NO. Aux 50µL préalablement prélevés dans les plaques avant ajout de [H³]-thymidine, on ajoute un volume équivalent de réactif de Greiss (1% sulphanilamide, 0,1% *N*-naphtylethylenediamine dihydrochloride, 2,5% acide phosphorique). L'absorbance est lue à une densité optique de 550nm à l'aide d'un lecteur automatisé de plaques puis la concentration de nitrite est estimée selon la courbe standard de nitrite.

Injection de LPS

Cette procédure suit les mêmes directives que le projet de cinétique. Cependant, au jour 10 post brûlure, les animaux reçoivent une injection intra-péritonéale de 250µg de LPS (E.Coli O111 :B4, Sigma) ou bien une quantité identique de solution saline pour les animaux contrôles. Les souris furent ensuite surveillées après 1h, 2h, 4h, 8h, et enfin toutes les 12 heures afin de prendre en note les signes extérieurs d'infections ou de compter les décès s'il y a lieu. Ces signes comprenaient fourrure ébouriffée, perte de poids, décharge oculaire, posture, hyperthermie, ataxie, tremblements. (80) Nous procédâmes à l'euthanasie des animaux présentant un état trop critique selon les règles émises par le comité institutionnel de protection des animaux.

IV. RÉSULTATS

Les résultats obtenus au cours de la première série d'expériences s'avèrent aller à l'encontre de ce qui avait été observé lors de précédentes études au sein de notre laboratoire (8, 81), soient les effets positifs sur la prolifération des lymphocytes et la diminution du stress oxydatif lors de l'administration d'une diète faible en gras (1%) après une brûlure. Ceci nous a conduit à mener une expérience contrôle destinée à observer uniquement l'effet de la diète faible en gras sur le système immunitaire sans le paramètre des différentes périodes d'administration. Nous avons suite à cela mené une nouvelle étude sur les effets de la diète faible en gras sur l'immunosuppression suivant une brûlure grave avec administration de la diète sur différentes périodes pour tenter à nouveau d'élaborer une hypothèse concernant un possible mécanisme d'action. Les résultats obtenus lors des deux séries d'expériences mettant en jeu une cinétique de l'effet de la diète faible en gras étant particulièrement différents, et la réalisation de ces expériences étant très espacée dans le temps, nous n'avons pas combiné les résultats pour obtenir des cohortes plus nombreuses mais décidé de comparer les différences obtenues. Les appellations de première et seconde série d'expériences réfèrent aux études impliquant la cinétique, la série d'expériences contrôle réfère à l'étude ne se concentrant que sur l'administration de la diète faible en gras au cours de 10 jours.

1. Consommation de nourriture et variation du poids des souris

Consommation de nourriture

Les souris ainsi que la nourriture de chaque cage furent pesées chaque jour afin d'observer si la quantité de lipides contenus dans la diète ou la brûlure affecte la consommation de nourriture et donc le statut nutritionnel de l'animal ainsi que sa croissance, pouvant éventuellement influencer des altérations d'ordre immunitaire.

L'apport alimentaire est calculé selon la consommation moyenne de diète faible en gras (1% de gras) ou de diète standard de l'animalerie (Chow, 5% de gras) par groupe. Pour chaque série d'expériences, les résultats sont issus de deux expériences indépendantes pour chaque diète. Pour les groupes de souris ayant reçues deux diètes différentes au cours de l'expérience, la première colonne fait état de la consommation de diète faible en gras pendant 4 à 9 jours selon les groupes (jour 4 à jour 9), et la seconde colonne réfère à la consommation de diète standard après la période au cours de laquelle la diète spéciale était requise, donc de 6 à 1 jours.

D'après les observations faites, les souris ayant été brûlées présentent globalement une consommation de nourriture sensiblement supérieure à celle des souris contrôles non brûlées si l'on se fie à l'apport calorique quotidien pour chaque groupe (tableaux I à III). Cette consommation accrue de nourriture confirme l'état d'hypermétabolisme dans lequel l'organisme se trouve suite à une brûlure. Les souris mangent donc plus pour pouvoir contrer aux pertes d'énergie induites par cet hypermétabolisme. Il apparaît toutefois, d'après l'apport calorique par jour, que les souris brûlées recevant d'abord la diète faible en gras semblent augmenter leur consommation lorsque la diète est changée pour une diète standard (tableaux I et III). Ceci pourrait être attribué au fait que les diètes chow standard stimuleraient les souris à augmenter leur apport de nourriture. (82) La consommation de nourriture des souris pour les première et seconde séries d'expériences reflètent les résultats qui furent observés lors de la précédente étude (8), bien que la consommation dans ce cas soit légèrement inférieure. Dans le cas de l'expérience

contrôle en revanche, les groupes de souris ont consommé jusqu'à 160g (groupe des souris brûlées 1%) de nourriture de plus en 10 jours (388,1 g soit 141 kcal/jour consommé contre 228,3 g soit 86 kcal/jour précédemment).

Les souris brûlées consommant globalement une quantité de nourriture supérieure à celle des souris contrôles qui n'ont pas subi de manipulations chirurgicales ni de brûlure, nous pouvons conclure que ces manipulations n'ont donc pas directement affecté la consommation de nourriture des souris. Le paramètre susceptible d'influencer l'apport alimentaire est la réponse physiologique induite par une brûlure et l'état d'hypermétabolisme qui se développe.

Tableau I : Apport alimentaire cumulé au cours de 10 jours pour chaque groupe lors de la première série d'expériences (entre parenthèses l'apport calorique par jour pour 5 ou 6 souris selon les groupes en kcal/jour). Les groupes Contrôles ou Brûlées chow et J10 reçurent une même diète pendant 10 jours consécutifs tandis que les groupes J4 à J9 reçurent la diète faible en lipides pendant 4 à 9 jours suivi de l'administration de la diète standard pour le reste des 10 jours de l'expérience.

| | DIÈTES en g (kcal/jour) | |
|-----------------------|-------------------------|--------------------|
| | Faible en gras (1%) | Chow Standard (5%) |
| Contrôles chow (n=6) | - | 197,7 (65) |
| Brûlées chow (n=6) | - | 183,6 (61) |
| Contrôles 1% (n=6) | 182,7 (66) | - |
| Brûlées Jour 4 (n=5) | 62,7 (57) | 129,7 (71) |
| Brûlées Jour 5 (n=5) | 86,9 (63) | 102,5 (68) |
| Brûlées Jour 6 (n=5) | 107,9 (65) | 86,6 (71) |
| Brûlées Jour 7 (n=5) | 117,1 (61) | 69,2 (76) |
| Brûlées Jour 8 (n=5) | 143,5 (65) | 45,3 (75) |
| Brûlées Jour 9 (n=5) | 157,5 (64) | 16,8 (55) |
| Brûlées Jour 10 (n=5) | 191,0 (70) | - |

Tableau II : Apport alimentaire cumulé au cours de 10 jours pour chaque groupe lors de la série d'expériences contrôle (avec entre parenthèses l'apport calorique par jour pour 10 souris en kcal/jour). Les groupes reçurent une même diète pendant les 10 jours consécutifs de l'expérience.

| | DIÈTES en g (kcal/jour) | |
|-----------------------|-------------------------|--------------------|
| | Faible en gras (1%) | Chow Standard (5%) |
| Contrôles CHOW (n=10) | - | 250,7 (83) |
| Brûlées CHOW (n=10) | - | 394,2 (130) |
| Contrôles 1% (n=10) | 339,2 (123) | - |
| Brûlées 1% (n=10) | 388,1 (141) | - |

Tableau III : Apport alimentaire cumulé au cours de 10 jours pour chaque groupe lors de la seconde série d'expériences (avec entre parenthèses l'apport calorique par jour pour 5 ou 6 souris selon les groupes en kcal/jour). Les groupes Contrôles ou Brûlées chow et J10 reçurent une même diète pendant 10 jours consécutifs tandis que les groupes J4 à J9 reçurent la diète faible en lipides pendant 4 à 9 jours suivi de l'administration de la diète standard pour le reste des 10 jours de l'expérience.

| | DIETES en g (kcal/jour) | |
|-----------------------|-------------------------|--------------------|
| | Faible en gras (1%) | Chow Standard (5%) |
| Contrôles chow (n=6) | - | 189,1 (63) |
| Brûlées chow (n=5) | - | 198,3 (65) |
| Contrôles 1% (n=5) | 148,9 (54) | - |
| Brûlées Jour 4 (n=5) | 64,3 (59) | 130,5 (72) |
| Brûlées Jour 5 (n=5) | 84,1 (61) | 153,7 (101) |
| Brûlées Jour 6 (n=5) | 98,6 (60) | 87,5 (72) |
| Brûlées Jour 7 (n=5) | 127,2 (66) | 69,0 (76) |
| Brûlées Jour 8 (n=5) | 135,2 (62) | 39,1 (65) |
| Brûlées Jour 9 (n=5) | 164,7 (67) | 16,0 (53) |
| Brûlées Jour 10 (n=5) | 175,9 (64) | - |

Variation du poids des souris

Dans le cas des souris ayant reçu la même diète au cours de toute l'expérience, la variation de poids est calculée en faisant la différence du poids des souris le jour du sacrifice moins le poids du jour de l'expérience, puis en faisant la moyenne de cette différence pour chaque groupe. Dans le cas des souris ayant reçu la diète faible en gras puis la diète standard, la variation de poids est calculée en faisant la différence entre le poids des souris le dernier jour où elles reçoivent la diète faible en gras moins le poids le jour de l'expérience, puis en établissant une moyenne de cette variation pour chaque groupe. Nous calculons ensuite la variation de poids liée à la consommation de diète standard en faisant la différence entre le poids des souris le jour du sacrifice moins le poids des souris le jour où elles commencent à recevoir cette nouvelle diète, suivie de la moyenne de cette variation pour chaque groupe.

Le poids des souris a été ajusté en soustrayant, dans le cas des souris brûlées, le poids de la pompe Alzet qui a été insérée ainsi que le volume de buprénorphine diffusée chaque jour.

Les résultats de la première expérience (tableau IV) montrent une grande variation et ne tiennent compte d'aucune tendance particulière propre aux groupes contrôles ou aux groupes brûlés. Les souris des groupes jour 5, 6, 9 semblent gagner du poids avec la diète faible en gras mais en perdre dès le changement vers la diète standard alors que à l'inverse, les souris des groupes jour 7 et 8 connaissent une perte de poids avec la première diète puis en gagnent à nouveau avec la seconde. D'après le tableau I pourtant, on n'observe pas de différence majeure d'apport calorique entre ces différents groupes. On ne peut donc pas conclure, basé uniquement sur ces observations, si les diètes ont un effet particulier au niveau de la croissance de l'animal. La physiologie de chaque souris diffère peut être sensiblement de l'une à l'autre et l'état d'hypermétabolisme peut être plus prononcé chez certaines ce qui pourrait expliquer pourquoi deux groupes ayant un apport calorique semblable vont avoir tendance à perdre du poids ou à en gagner et maintenir une croissance adéquate.

Si l'on compare avec la précédente étude (8), les groupes Contrôles et Brûlées chow avaient perdu plus de poids, malgré une consommation de nourriture plus importante que lors de notre étude, et les Brûlées J10 avaient gagné moins de poids. Seul le groupe Contrôle 1% démontrait une croissance à peine supérieure à ce que nous observons ici. Nous ne pouvons comparer la croissance des autres groupes auxquels ont été administrées les deux diètes différentes, nous ne comparerons de même que les groupes ayant reçu une même diète pendant 10 jours pour les comparaisons mentionnées ultérieurement. La consommation légèrement réduite de diète dans notre n'a donc nullement altéré la croissance des souris.

Dans le cas de l'expérience contrôle, qui ne met pas en jeu les différentes durées au cours desquelles la diète faible en gras est administrée mais visait à confirmer l'effet de la diète faible en gras sur le système immunitaire comparé à une diète standard, nous constatons une nette croissance des souris contrôles comparées aux souris brûlées (tableau V). L'apport calorique des souris brûlées (tableau II) était pourtant supérieur à celui des souris contrôles, ceci confirme encore la présence de cet hypermétabolisme prononcé après une brûlure. Dans cette expérience, si la croissance des souris brûlées recevant la diète faible en gras semble très modérée, elle apparaît être négative pour le groupe des souris brûlées recevant la diète standard malgré un apport alimentaire adéquat. On ne peut toutefois s'exprimer sur l'avantage d'une diète faible en lipides par rapport à la diète standard basé sur ce seul résultat, d'autant plus que les variations moyennes de poids des groupes recevant la diète faible en lipides au tableau I évoquaient une croissance retardée dans ces groupes. Lors de la précédente étude (8), les groupes de souris nourries avec une diète à 5% de poids présentèrent tout deux une perte de poids contre un mince gain pour les souris alimentées avec une diète à 1% de gras. Dans notre expérience, les groupes de souris avec la diète à 1% de gras présentent une croissance plus importante. Le groupe de souris brûlées recevant la diète standard démontre une perte de poids inférieure et le groupe Contrôle chow à l'inverse démontre une importante croissance. Ceci coïncide avec l'apport calorique beaucoup plus important observé lors de notre étude lorsque comparé à l'étude antérieure.

Les variations moyennes de poids obtenues au cours de la seconde série d'expérience démontrent en revanche une croissance compromise dans le cas de tous les groupes, y compris le groupe contrôle de souris non brûlées, ayant été alimenté avec la diète basse en lipides (tableau VI). Cette perte de poids est immédiatement inversée lorsque les souris reçoivent la diète standard après une période déterminée. On pourrait à priori supposer que les souris après la brûlure ont pu avoir plus de difficulté momentanément à se nourrir, hors dans ce cas le groupe contrôle aurait du afficher une prise de poids. On ne peut donc évoquer cette raison pour expliquer cette tendance. L'état d'hypermétabolisme peut expliquer la perte moyenne de poids chez les souris brûlées, qui aurait été par la suite contré par une surconsommation de nourriture standard. Une alimentation insuffisante pourrait être à l'origine de la perte de poids chez les contrôles. Les quantités d'eau et de nourriture furent vérifiées chaque jour pour chaque cage, il n'est donc pas possible qu'elles aient pu manquer de nourriture. Cet apport insuffisant serait donc directement lié au comportement des souris elles mêmes.

On dénote une tendance inverse lors de l'étude antérieure (8). Les groupes alimentés avec une diète à 5% de gras avaient perdus de poids contre un gain dans ce cas, et les souris avec la diète faible en lipides (Contrôles et J10) en avaient gagné, contre une perte ici. Les souris lors de notre expérience, au sein de ces 4 groupes, présentent une consommation de nourriture inférieure à l'étude précédente. Ceci pourrait expliquer la perte de poids chez les souris Contrôles 1% et J10, mais ne coïncide toutefois pas avec la croissance observée chez les groupes avec la diète standard. Ces variations seraient donc à attribuer au comportement et à la physiologie des souris utilisées lors de chaque expérience, qui peuvent légèrement différer d'un animal à l'autre.

Tableau IV : Variation de poids moyenne des souris par groupe entre le jour de l'expérience et le jour du sacrifice lors de la première série d'expériences. Les groupes Contrôles ou Brûlées chow et J10 reçurent une même diète pendant 10 jours consécutifs tandis que les groupes J4 à J9 reçurent la diète faible en lipides pendant 4 à 9 jours suivi de l'administration de la diète standard pour le reste des 10 jours de l'expérience. La variation moyenne du poids lors de l'administration de ces deux diètes a donc été estimée.

| | Variation du poids (en g) | |
|-----------------------|---------------------------|--------------------|
| | Faible en gras (1%) | Chow Standard (5%) |
| Contrôles chow (n=6) | - | -0,08 ± 1,60 |
| Brûlées chow (n=5) | - | -0,60 ± 0,92 |
| Contrôles 1% (n=6) | 0,62 ± 0,60 | - |
| Brûlées Jour 4 (n=5) | -1,22 ± 1,90 | -0,38 ± 2,15 |
| Brûlées Jour 5 (n=5) | 0,26 ± 0,86 | -0,29 ± 1,39 |
| Brûlées Jour 6 (n=5) | 0,74 ± 0,66 | -1,33 ± 0,73 |
| Brûlées Jour 7 (n=5) | -1,30 ± 0,86 | 3,06 ± 1,63 |
| Brûlées Jour 8 (n=5) | -0,49 ± 1,74 | 0,51 ± 0,41 |
| Brûlées Jour 9 (n=5) | 0,31 ± 0,51 | -0,19 ± 1,49 |
| Brûlées Jour 10 (n=5) | 0,69 ± 0,70 | - |

Tableau V : Variation de poids moyenne des souris par groupe entre le jour de l'expérience et le jour du sacrifice lors de l'expérience contrôle. Les groupes reçurent une même diète pendant 10 jours consécutifs.

| | Variation du poids (en g) | |
|------------------------|---------------------------|--------------------|
| | Faible en gras (1%) | Chow Standard (5%) |
| Contrôles chow (n=10) | - | 1,79 ± 0,70 |
| Brûlées chow (n=10) | - | -0,79 ± 0,67 |
| Contrôles 1% (n=10) | 1,66 ± 0,79 | - |
| Brûlées Jour 10 (n=10) | 0,37 ± 1,00 | - |

Tableau VI : Variation de poids moyenne des souris par groupe entre le jour de l'expérience et le jour du sacrifice lors de la seconde série d'expériences. Les groupes Contrôles ou Brûlées chow et J10 reçurent une même diète pendant 10 jours consécutifs tandis que les groupes J4 à J9 reçurent la diète faible en lipides pendant 4 à 9 jours suivi de l'administration de la diète standard pour le reste des 10 jours de l'expérience. La variation moyenne du poids lors de l'administration de ces deux diètes a donc été estimée.

| | Variation du poids (en g) | |
|-----------------------|---------------------------|--------------------|
| | Faible en gras (1%) | Chow Standard (5%) |
| Contrôles chow (n=6) | - | 0,88 ± 0,73 |
| Brûlées chow (n=5) | - | 0,38 ± 0,75 |
| Contrôles 1% (n=5) | -0,18 ± 0,77 | - |
| Brûlées Jour 4 (n=5) | -1,94 ± 0,35 | 1,65 ± 1,16 |
| Brûlées Jour 5 (n=5) | -1,34 ± 0,61 | 0,85 ± 0,59 |
| Brûlées Jour 6 (n=5) | -1,66 ± 0,71 | 1,58 ± 0,33 |
| Brûlées Jour 7 (n=5) | -1,53 ± 0,16 | 1,45 ± 0,25 |
| Brûlées Jour 8 (n=5) | -1,90 ± 0,62 | 0,66 ± 0,34 |
| Brûlées Jour 9 (n=5) | -1,63 ± 1,27 | 0,60 ± 1,20 |
| Brûlées Jour 10 (n=5) | - 1,13 ± 0,89 | - |

2. Prolifération des splénocytes *ex vivo* en réponse à divers stimuli selon la diète administrée

Les résultats sont exprimés à l'aide de l'index de prolifération qui nous permet d'évaluer la capacité des splénocytes à proliférer après une brûlure. Il représente le ratio de la prolifération des lymphocytes stimulés par un mitogène, dans ce cas LPS, ConA ou H57, sur les non stimulés. Chaque série d'expériences est issue de deux expériences individuelles réalisées à quelques jours d'intervalles dont nous avons combiné les résultats afin d'obtenir des groupes de $n=5$.

Première série d'expériences

La stimulation par le mitogène LPS est spécifique aux cellules B mais cette endotoxine peut également affecter l'activité des macrophages. Ces derniers peuvent libérer des cytokines sous l'action du LPS qui vont influencer également la prolifération des L_B . Les résultats (figure 1A) démontrent une prolifération significativement réduite des splénocytes des groupes J4 à J10 ayant été soumis à une brûlure ($p < 0.05$, $p < 0.01$ et $p < 0.005$ par rapport au groupe contrôle recevant la même diète pour J4, J6, J7 puis J5 et J9 et enfin J8 et J10 respectivement). Ceci laisse présumer que la brûlure a un impact sur la prolifération des cellules B et que la diète ne semble pas avoir d'effets bénéfiques, particulièrement pour les groupes jour 8 et jour 10. On remarque d'autant plus que les souris brûlées présentent un index de prolifération similaire à celui des souris contrôles, ce qui signifierait que dans le cadre de cette expérience, c'est la diète avec une proportion de gras de 5% qui semblerait avoir les meilleurs effets quant à la prolifération normale des lymphocytes. L'inhibition de la réponse au LPS avait été précédemment observée (8) avec l'administration de la diète faible en gras, mais il reste surprenant que le groupe des souris brûlées nourries avec la diète régulière présente de tels résultats.

Dans le cas de la stimulation par le mitogène polyclonal ConA (figure 1B), mitogène qui stimule la prolifération des cellules T et peut induire la libération de médiateurs produits

par les macrophages, on observe une réduction significative de la prolifération dans le cas des groupes jour 6, 8 et 9 par rapport au groupe contrôle recevant la même diète ($p < 0.05$), ainsi que par rapport au groupe des souris brûlées recevant la diète standard à 5% ($p < 0.005$ pour J6 et J9, $p < 0.01$ pour J8). On observe une tendance similaire pour J10 (avec $p < 0.05$). Ces résultats, tout comme la stimulation au LPS contredisent les effets escomptés, la diète faible en gras aurait dû à priori permettre aux cellules de proliférer normalement vis-à-vis des cellules des groupes contrôles, et une réduction significative de la prolifération dans le cas du groupe de souris brûlées ayant reçu la diète chow standard aurait été attendue. Hors non seulement ce groupe présente une prolifération normale par rapport aux groupes contrôles, mais en plus la prolifération des cellules des groupes ayant reçu la diète considérée bénéfique présentent une inhibition de la prolifération significativement réduite vis-à-vis du groupe des Brûlées chow. Ce qui laisse penser d'après ces observations que la diète à 5% de lipides serait dans ce cas un paramètre bénéfique quant à la prévention de l'immunosuppression après une brûlure.

Les groupes J4, J5 et J7 démontrent une réponse à priori normale au stimulus et une prolifération adéquate si l'on en juge par l'absence de différence significative avec le groupe contrôle. Hors si la diète a un effet positif sur le système immunitaire après avoir été administrée sur des périodes de 4, 5 ou 7 jours, il est difficile de penser qu'elle deviendrait néfaste si seulement administrée 6 jours ou sur une période plus longue. Les précédentes études à ce sujet démontraient une prolifération normale après consommation pour 4 ou 10 jours de cette diète. Si son effet est donc bénéfique après seulement 4 jours et se maintient après 10 jours, il est difficile de présumer que l'administration pour des périodes comprises entre les deux ait un effet inverse.

H57, un anticorps spécifique des récepteurs des cellules T, est un mitogène destiné à cibler la réponse des lymphocytes T en particulier. La prolifération des lymphocytes issus des souris ayant reçu la diète faible en gras s'avère normale vis-à-vis des groupes contrôles (figure 1C), et confirme dans ce cas l'action bénéfique d'une telle diète au niveau de l'immunosuppression après une brûlure grave. Il n'y a que le groupe J10 dont la prolifération apparaît significativement inhibée par rapport au groupe contrôle ayant

reçu la même diète ($p < 0.05$). Toutefois, nous remarquons également que la prolifération des lymphocytes de souris brûlées qui n'ont pas eu le support nutritionnel faible en gras demeure normale. La prolifération normale des groupes de souris brûlées soumises à la diète faible en gras ne présentant pas de différence significative avec le groupe de souris brûlées soumises à la diète standard, il est impossible d'attribuer les prolifération adéquate à l'administration de cette diète particulière.

Expérience contrôle.

Les résultats à priori aberrants obtenus lors de la première série d'expériences, particulièrement au niveau de la prolifération des splénocytes de souris brûlées nourries avec la diète standard, nous ont conduit à mener une étude contrôle afin de vérifier à nouveau l'effet de la diète faible en gras et de vérifier les méthodes employées (figure 2).

Après cette série d'expériences, nous avons obtenu comme précédemment observé (8) une prolifération normale pour les groupes contrôles nourris avec la diète standard et la diète faible en gras (C5% et C1% respectivement). Cette fois-ci en revanche, on observe une inhibition significative de la prolifération pour les splénocytes issus des souris qui ont reçu une diète standard, tous mitogènes confondus ($p < 0.005$ pour la stimulation au LPS et H57 et $p < 0.05$ dans le cas de la réponse à ConA). Ceci concorde avec les études précédentes et confirme l'effet immunosuppresseur de la brûlure lorsqu'aucun support nutritionnel particulier n'est administré. Toutefois, dans le cas des souris brûlées qui ont reçu la diète faible en gras, si la réponse proliférative des cellules B est restituée, les réponses aux mitogènes ConA et H57 ciblant les cellules T sont significativement inhibées ($p < 0.005$) (figure 1B, C). De plus, dans le cas de la stimulation par ConA, une différence entre le groupe des souris brûlées recevant la diète standard et le groupe des souris nourries à la diète faible en gras aurait été significative à une valeur de α égale à 0.0512, mettant d'autant plus en doute les avantages de l'utilisation de la diète particulière.

Cette expérience n'a donc pas permis de confirmer les effets bénéfiques de l'administration d'une diète basse en lipides sur l'immunosuppression engendrée par une brûlure grave. Elle n'aurait d'avantages que dans le cas des cellules B mais ne permettrait pas une prolifération normale des cellules T.

Seconde série d'expériences

Nous avons mené suite à cette expérience contrôle une nouvelle série de deux expériences incluant le paramètre de la cinétique pour l'administration de la diète (figure 3).

Une nouvelle fois nous n'avons pu trouver de différence significative entre la prolifération des groupes contrôles et de celle du groupe des souris brûlées ayant reçu la diète chow standard. Ce qui laisse penser que la brûlure n'aurait pas eu d'effets délétères au niveau des cellules du système immunitaire dans ce cas ou que la diète contenant 5% de lipides aurait eu un certain avantage quant à leur prolifération.

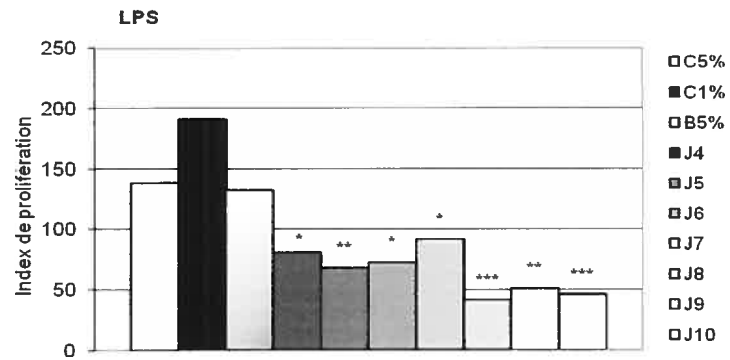
Les groupes auxquels a été administrée la diète faible en gras sur différentes périodes présentent des résultats divers quant à la prolifération des cellules après stimulation par un mitogène.

La réponse des cellules B au LPS (figure 3A) s'avère normale pour les groupes J4 ainsi que J7 à J10 ce qui coïncide avec les résultats de l'expérience contrôle mais contredit les résultats de notre première série d'expériences et les observations faites précédemment (8). Les groupes J5 et J6 démontrent toutefois une inhibition significativement inhibée par rapport au groupe contrôle ayant reçu une diète similaire ($p < 0.05$). Une prolifération normale est également observée dans le cas de la stimulation avec ConA (figure 3B), hormis pour le groupe J5 ($p < 0.05$), en accordance avec la précédente étude (8). Toutefois, dans le cas de la stimulation au LPS et ConA, aucune différence significative n'est observée entre la prolifération des cellules de souris brûlées alimentées avec la diète faible en gras pendant une certaine période et celles qui ont reçu une diète standard sur

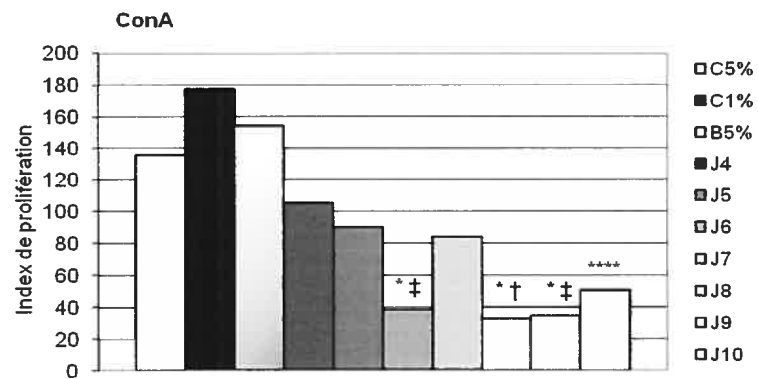
les 10 jours. Ceci et le fait qu'aucune différence importante n'est observée entre ce dernier groupe et les groupes contrôles nous empêche d'attribuer cette prolifération normale à la seule administration de la diète faible en lipides.

La réponse proliférative après stimulation par H57 (figure 3C) fait état d'une inhibition de manière significative de la prolifération des lymphocytes T des groupes de souris brûlées alimentées avec la diète faible en gras sauf dans le cas des groupes J7, 8 et J10 ($p < 0.05$ pour J4 à J6 et $p < 0.01$ pour J9). De plus, une différence significative est observée vis-à-vis du groupe de souris brûlées dépourvues du support nutritionnel de la diète faible en gras pour les groupes J5, J6 ainsi que J9 ($p < 0.05$). Une fois encore la diète faible en lipides ne semble pas avoir d'effets avantageux vis-à-vis de l'immunosuppression hormis pour le cas de 3 groupes, mais il apparaît en plus que la diète standard offre un meilleur support nutritionnel, ce qui va à l'encontre de ce qui été précédemment observé.

A.



B.



C.

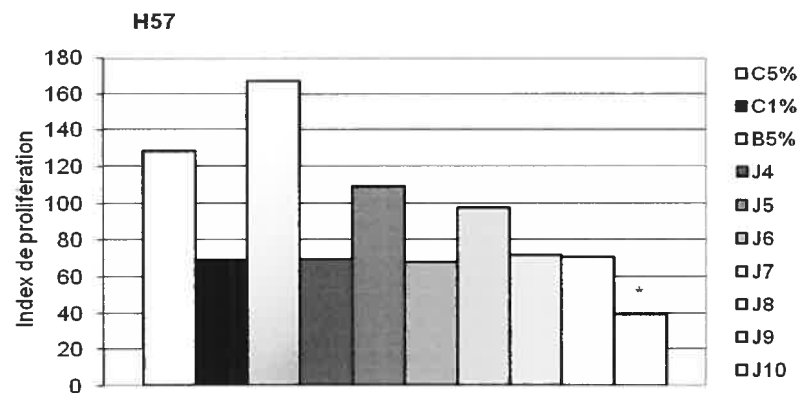
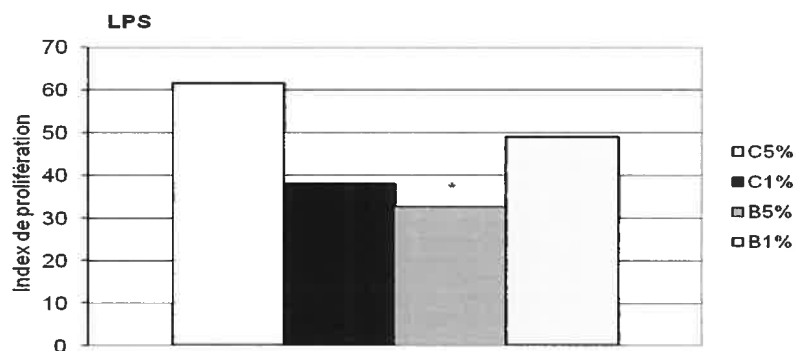
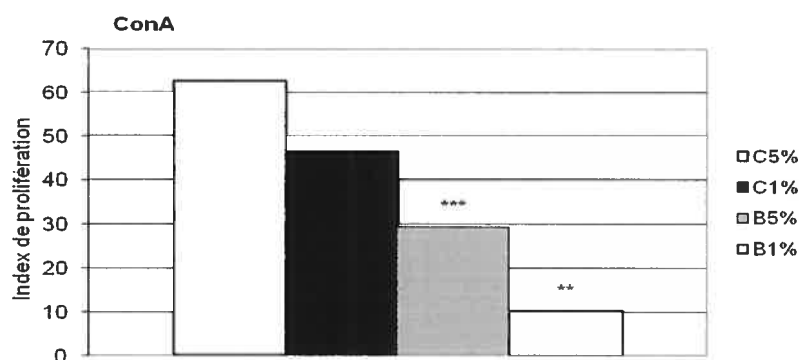


Figure 1: Effets de la brûlure et de l'administration d'une diète faible en gras (1%), sur différentes périodes (J4 à J10), comparée à une diète standard (Chow 5%) sur la réponse des splénocytes après activation par des mitogènes: (A) LPS, (B) ConA, (C) H57. (Première série d'expériences.) Les souris, 5 par groupe, ont été nourries avec la diète faible en gras et/ou la diète standard pendant 10 jours après la brûlure ou « fausse brûlure », les rates furent collectées au jour 10. Les splénocytes de chaque souris, à raison de $2,22 \times 10^5$ par puits, furent stimulées en triplicata avec LPS (50 μ g/mL), ConA (1 μ g/mL) ou un anticorps anti-TcR H57 (1 μ g/mL). Les plaques furent ensuite incubées pour une durée de 66h puis en présence de [H^3]-thymidine pour une période additionnelle de 6h. L'index de prolifération représente le ratio de la prolifération des lymphocytes stimulés par un mitogène sur les non-stimulés. * $P < 0,05$ pour brûlées faible en gras vs contrôles faible en gras, ** $P < 0,01$ pour brûlées faible en gras vs contrôles faible en gras, *** $P < 0,005$ pour brûlées faible en gras vs contrôles faible en gras, **** $P < 0,05$ pour brûlées faible en gras vs brûlées chow 5%, ‡ $P < 0,005$ pour brûlées faible en gras vs brûlées chow 5%, † $P < 0,01$ pour brûlées faible en gras vs brûlées chow 5%.

A.



B.



C.

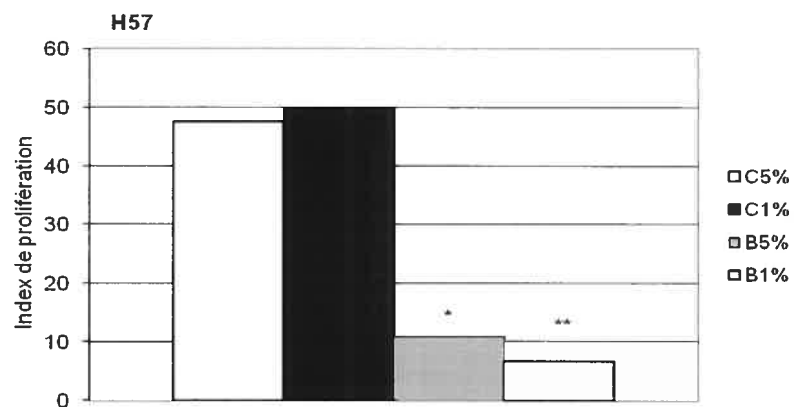
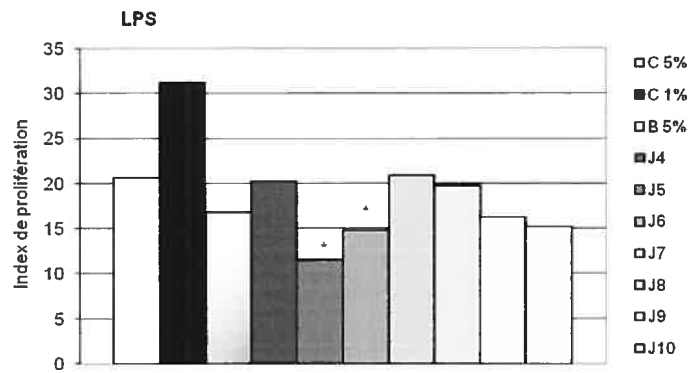
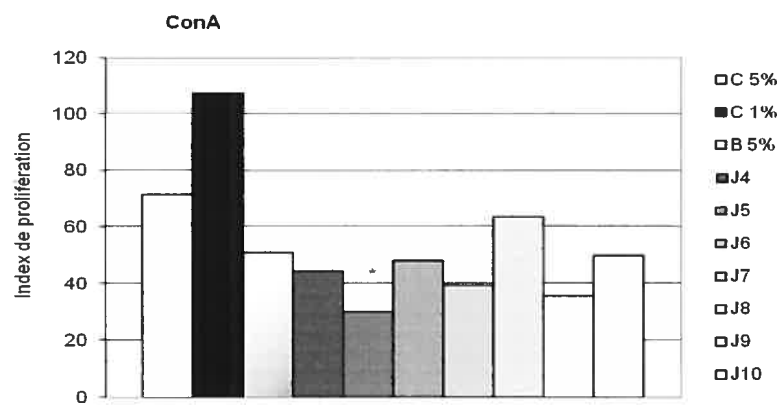


Figure 2: Effets de la brûlure et de l'administration d'une diète faible en gras (1%) comparée à une diète standard (Chow 5%) sur la réponse des splénocytes après activation par des mitogènes: (A) LPS, (B) ConA, (C) H57. (Expérience contrôle) Les souris, 10 par groupe, ont été nourries avec la diète faible en gras ou la diète standard pendant 10 jours après la brûlure ou « fausse brûlure », les rates furent collectées au jour 10. Les splénocytes de chaque souris, à raison de $2,22 \times 10^5$ par puits, furent stimulées en triplicata avec LPS ($50 \mu\text{g/mL}$), ConA ($1 \mu\text{g/mL}$) ou un anticorps anti-TcR H57 ($1 \mu\text{g/mL}$). Les plaques furent ensuite incubées pour une durée de 66h puis en présence de $[\text{H}^3]$ -thymidine pour une période additionnelle de 6h. L'index de prolifération représente le ratio de la prolifération des lymphocytes stimulés par un mitogène sur les non-stimulés. * $P < 0,005$ pour brûlées chow 5% vs contrôles chow 5%, ** $P < 0,005$ pour brûlées faible en gras vs contrôles faible en gras, *** $P < 0,05$ pour brûlées chow 5% vs contrôles chow 5%.

A.



B.



C.

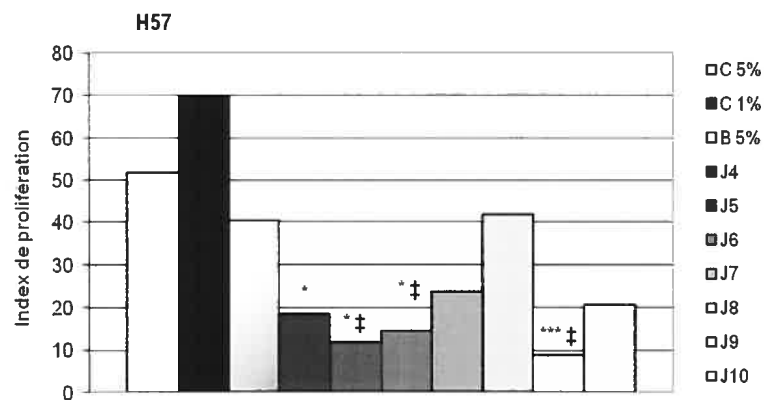


Figure 3: Effets de la brûlure et de l'administration d'une diète faible en gras (1%), sur différentes périodes (J4 à J10), comparée à une diète standard (Chow 5%) sur la réponse des splénocytes après activation par des mitogènes: (A) LPS, (B) ConA, (C) H57. (Seconde série d'expériences.) Les souris, 5 par groupe, ont été nourries avec la diète faible en gras et/ou la diète standard pendant 10 jours après la brûlure ou « fausse brûlure », les rates furent collectées au jour 10. Les splénocytes de chaque souris, à raison de $2,22 \times 10^5$ par puits, furent stimulées en triplicata avec LPS (50 μ g/mL), ConA (1 μ g/mL) ou un anticorps anti-TcR H57 (1 μ g/mL). Les plaques furent ensuite incubées pour une durée de 66h puis en présence de [H^3]-thymidine pour une période additionnelle de 6h. L'index de prolifération représente le ratio de la prolifération des lymphocytes stimulés par un mitogène sur les non-stimulés. * $P < 0,05$ pour brûlées faible en gras vs contrôles faible en gras, ** $P < 0,01$ pour brûlées faible en gras vs contrôles faible en gras, *** $P < 0,005$ pour brûlées faible en gras vs contrôles faible en gras, **** $P < 0,05$ pour brûlées faible en gras vs brûlées chow 5%, ‡ $P < 0,005$ pour brûlées faible en gras vs brûlées chow 5%, † $P < 0,01$ pour brûlées faible en gras vs brûlées chow 5%.

3. Production de NO *in vitro* par les splénocytes en réponse à divers stimuli selon la diète administrée

La brûlure s'accompagne d'un stress oxydatif et de libération de NO qui contribue au développement de l'immunosuppression. D'après les précédentes observations (8), une diète faible en lipides, comparée à une diète plus riche en gras, permet de réduire la production et donc libération de NO et favoriser ainsi une meilleure activité des cellules immunitaires. La concentration de NO a été quantifiée par colorimétrie à l'aide du réactif de Greiss qui permet de déterminer la concentration des métabolites du NO, soit NO_2^- et NO_3^- dans le surnageant des cultures cellulaires après une incubation de 66h. L'index de concentration utilisé représente le ratio des splénocytes stimulés par les mitogènes sur les non stimulés.

Première série d'expériences

A l'image des résultats obtenus au sujet de la prolifération des splénocytes (figure 1), le groupe de souris brûlées n'ayant pas reçu de support nutritionnel faible en gras ne présente pas de production accrue de NO par rapport aux autres groupes contrôles ou aux groupes dont les souris ont été alimentées avec une diète faible en gras pour au moins une certaine période (figure 4). Ce qui toutefois est en accord avec la prolifération normale observée précédemment, l'absence de production accrue de NO n'a donc pu engendrer d'état d'immunosuppression et donc être délétère au niveau de la prolifération des cellules de ce groupe.

Les groupes ayant reçu une alimentation faible en lipides pour des durées de 4 à 10 jours ne présentent pas non plus globalement de production accrue de NO ni de réduction ce qui pourtant été l'effet escompté de la diète. L'inhibition de la prolifération des splénocytes observée dans la figure 1 (A et B) ne peut donc être attribuée à la production soutenue de NO et son effet immunosuppresseur.

Dans le cas du groupe J8 dont les splénocytes ont été stimulés par ConA (figure 4B), on note une réduction significative de la production de NO par rapport au groupe contrôle soumis à la même diète et le groupe de souris brûlées recevant la diète standard ($p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement). Hors le même groupe présente une prolifération inhibée de manière significative lorsque stimulé par ConA (figure 1). On ne peut donc attribuer cette inhibition de la prolifération à la production de NO.

En revanche nous observons lors de la stimulation par H57 (figure 4C) que les cellules des groupes J6 ainsi que J10 ont une production plus importante de NO, sans différence significative avec le groupe contrôle mais nettement supérieure à la production engendrée par le groupe de souris brûlée soumises à la diète standard ($p < 0,05$). Une fois encore dans ce cas précis, la diète faible en lipides ne semble pas avoir eu d'effet bénéfique quant à la production de NO mais aurait même protégé les souris moins par rapport à une diète standard.

Globalement, d'après les figure 1 et figure 4, nous ne pouvons trouver de corrélation entre l'état d'immunosuppression et la production de NO post-brûlure.

Expérience contrôle

L'index de concentration observé dans le cas de l'expérience contrôle, et ce en réponse à tous les mitogènes, est relativement élevé par rapport aux résultats auxquels nous nous serions attendus (figure 5). Notamment dans le cas des contrôles qui, malgré l'absence de brûlure qui est une cause de l'hyperactivité des macrophages et donc de la surproduction de NO, semblent présenter une production plus accrue que les groupes de souris brûlées qui ont reçu la diète faible en lipides ou non. On note particulièrement que dans le cas des souris brûlées soumise à la diète standard, la production de NO est significativement inférieure au taux du groupe de souris non-brûlées (figure 5A et C) ($p < 0,05$). Ceci va à l'encontre des observations précédentes comme quoi la diète faible en gras à un effet bénéfique quant à la restriction de la production de NO suite à brûlure.

La concentration de NO observée chez les groupes de souris brûlées nourries à la diète faible en gras (figure 4B et C) pourrait coïncider avec l'inhibition de la prolifération observée dans la figure 2. En revanche, ceci s'oppose à l'inhibition de la prolifération des splénocytes dans le cas des souris brûlées soumises à la diète standard (figure 2) qui est associée pourtant à une réduction de la production de NO (figure 4A et C).

Cette expérience et ces résultats ne nous permettent donc pas non plus d'associer la production de NO à l'état d'immunosuppression après une brûlure, pas plus que de confirmer les effets de la diète faible en lipides sur le système immunitaire.

Seconde série d'expériences

Les groupes contrôles, souris non-brûlées nourries à la diète standard ou faible en gras, démontrent une production de NO particulièrement faible (figure 6) qui, étant donné que sa production est exacerbée par l'effet de la brûlure, coïncide avec nos attentes et avec la prolifération normale observée à la figure 3. Le groupe des souris brûlées présente toutefois une concentration similaire, qui toutefois va de pair avec la prolifération normale dénotée à la figure 3. La diète standard semblerait donc ici avoir les effets attendus de la part de la diète faible en lipides.

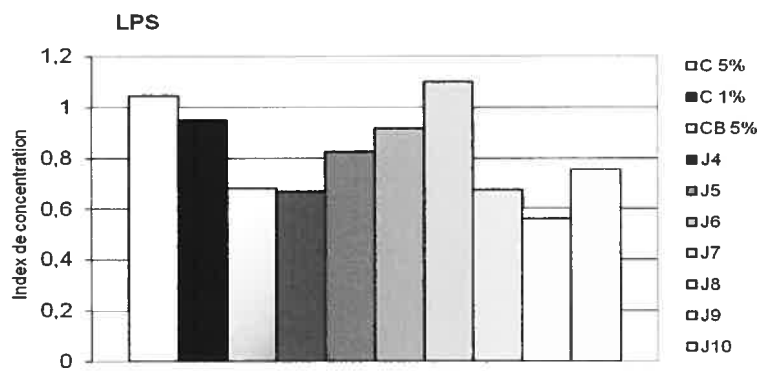
Les groupes J4 à J8, hormis dans le cas de la stimulation au LPS (figure 6A), démontrent une production de NO similaire aux groupes contrôles, soit la diète a permis la réduction de NO soit la brûlure n'a pas eu l'effet de suractivation des macrophages. L'inhibition de la prolifération des splénocytes des groupes J4 à J6 (figure 3) ne serait donc pas associée à une production trop importante de médiateur NO.

On observe en revanche une production très importante de NO dans le cas des groupes J9 et J10 en réponse aux trois mitogènes, ainsi que J8 pour ce qui est de la stimulation par ConA. Cette surproduction massive de médiateurs ne coïncide toutefois pas à l'inhibition de la prolifération des splénocytes. Comme l'illustre la figure 3, la prolifération pour ces

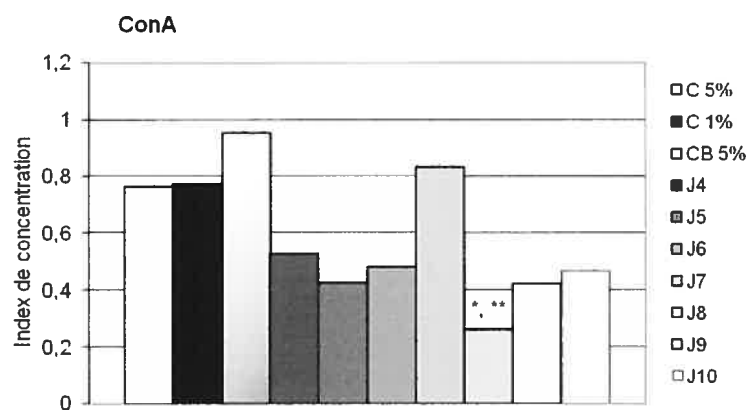
groupes, sauf dans le cas de la réponse du groupe J9 à H57, était normale comparée aux groupes contrôles. Il n'y aurait que dans le cas du groupe J9 que nous pourrions donc associer la surproduction de NO à une inhibition de la prolifération des lymphocytes T. La production importante de NO observée pour les autres groupes n'a pas eu d'effet quant à la prolifération des cellules.

Dans ce cas ci également nous ne pouvons donc trouver d'association entre la production de NO et l'induction d'une inhibition de la prolifération des splénocytes, nous ne pouvons aussi confirmer l'effet positif d'une diète faible en gras, la diète standard administrée à des souris brûlées n'ayant pas eu d'effets plus délétères.

A.



B.



C.

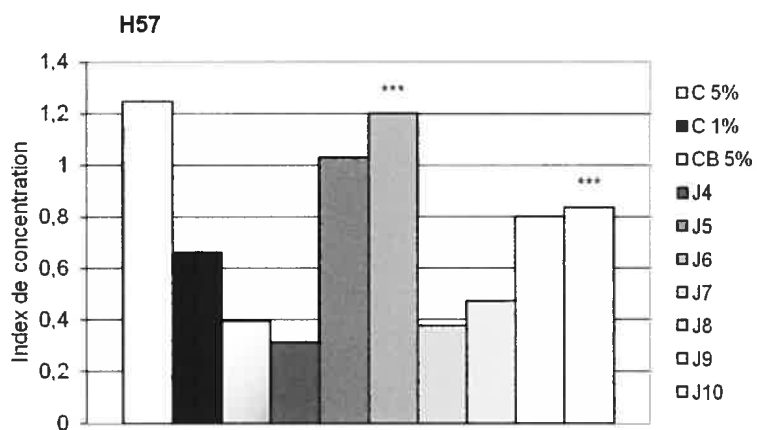
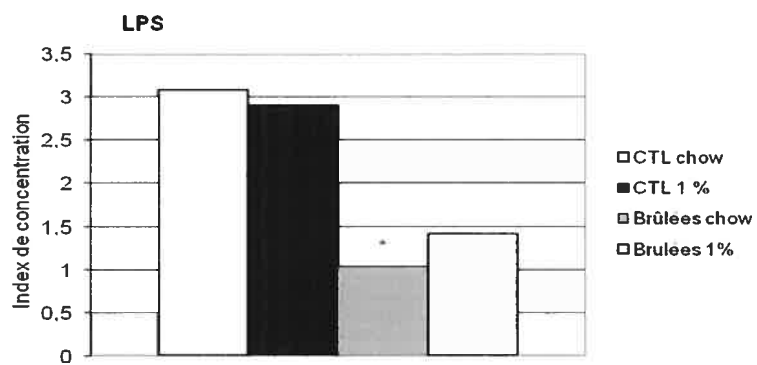
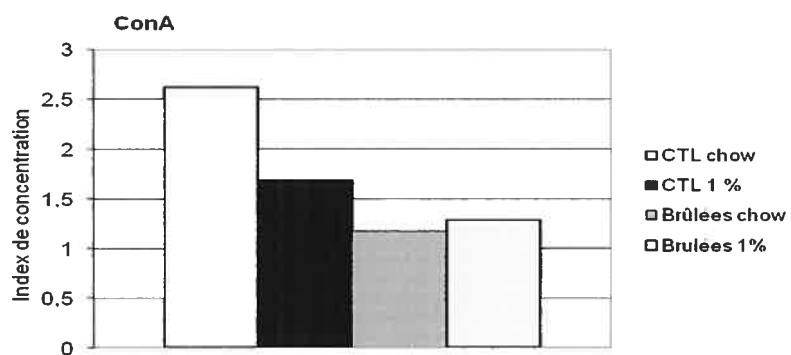


Figure 4 : Évaluation du stress oxydatif après une brûlure grave selon la production de NO. (Première expérience) Les souris, 5 par groupe, ont été nourries avec la diète faible en gras et/ou la diète standard pendant 10 jours après la brûlure ou « fausse brûlure », les rates furent collectées au jour 10. Les splénocytes de chaque souris, à raison de $2,22 \times 10^5$ par puits, furent stimulées en triplicata avec LPS ($50\mu\text{g/mL}$), ConA ($1\mu\text{g/mL}$) ou un anticorps anti-TcR H57 ($1\mu\text{g/mL}$). Les plaques furent ensuite incubées pour une durée de 66h. $50\mu\text{L}$ de surnageant sont ensuite prélevés dans les cultures cellulaires, on y ajoute un volume équivalent de réactif de Greiss (1% sulphanilamide, 0,1% *N*-naphtylethylenediamine dihydrochloride, 2,5% H_3PO_4). L'absorbance est lue à 550nm à l'aide d'un lecteur automatisé de plaques puis la concentration de nitrite est estimée selon la courbe standard de nitrite. * $P < 0,05$ pour brûlées faible en gras vs contrôles faible en gras, ** $P < 0,01$ pour brûlées faible en gras vs brûlées chow, *** $P < 0,05$ pour brûlées faible en gras vs brûlées chow.

A.



B.



C.

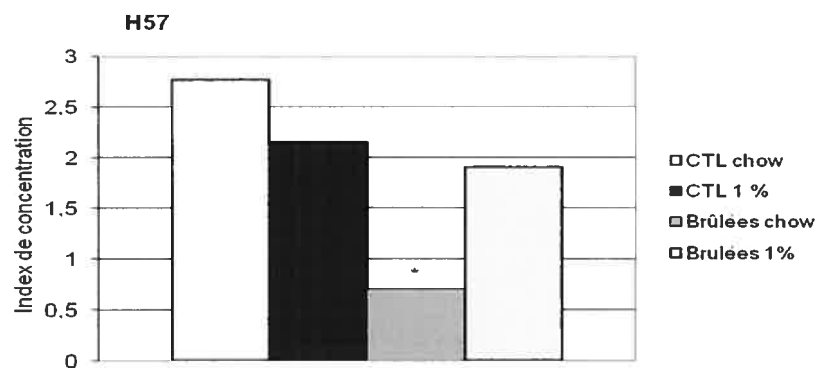
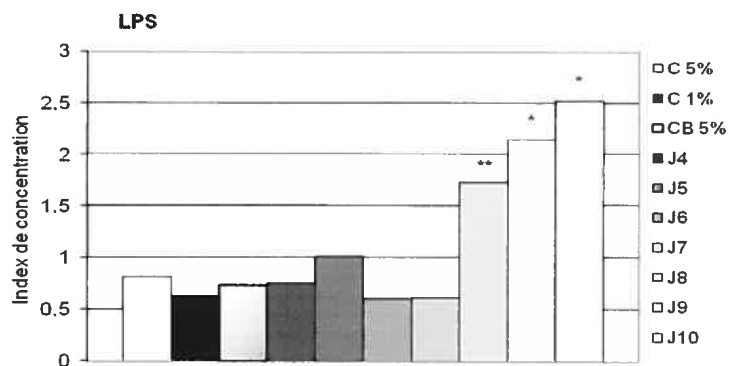
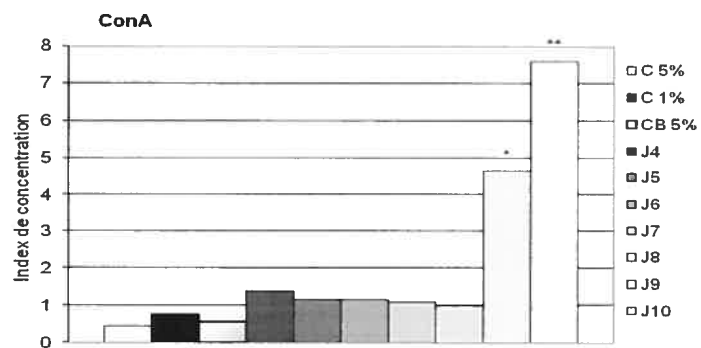


Figure 5: Évaluation du stress oxydatif après une brûlure grave selon la production de NO. (Expérience contrôle) Les souris, 10 par groupe, ont été nourries avec la diète faible en gras et/ou la diète standard pendant 10 jours après la brûlure ou « fausse brûlure », les rates furent collectées au jour 10. Les splénocytes de chaque souris, à raison de 2×10^5 par puits, furent stimulées en triplicata avec LPS ($50 \mu\text{g/mL}$), ConA ($1 \mu\text{g/mL}$) ou un anticorps anti-TcR H57 ($1 \mu\text{g/mL}$). Les plaques furent ensuite incubées pour une durée de 66h. 50 μL de surnageant sont ensuite prélevés dans les cultures cellulaires, on y ajoute un volume équivalent de réactif de Greiss (1% sulphanilamide, 0,1% *N*-naphtylethylenediamine dihydrochloride, 2,5% H_3PO_4). L'absorbance est lue à 550nm à l'aide d'un lecteur automatisé de plaques puis la concentration de nitrite est estimée selon la courbe standard de nitrite. * $P < 0,05$ pour brûlées faible en gras vs contrôles faible en gras, ** $P < 0,01$ pour brûlées faible en gras vs brûlées chow, *** $P < 0,05$ pour brûlées faible en gras vs brûlées chow. * $P < 0,05$ pour brûlées chow vs contrôles chow.

A.



B.



C.

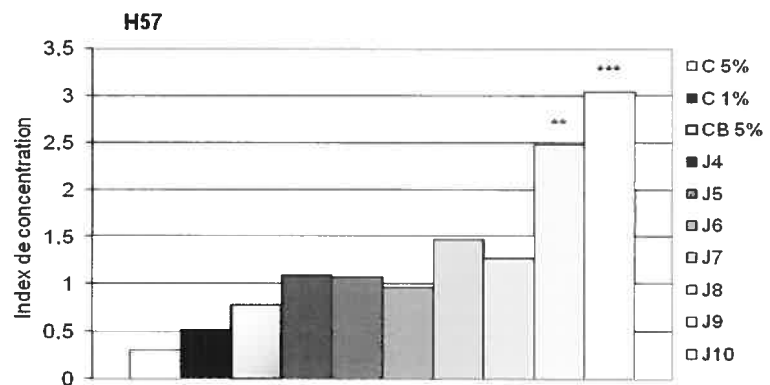


Figure 6 : Évaluation du stress oxydatif après une brûlure grave selon la production de NO. (Seconde expérience) Les souris, 5 par groupe, ont été nourries avec la diète faible en gras et/ou la diète standard pendant 10 jours après la brûlure ou « fausse brûlure », les rates furent collectées au jour 10. Les splénocytes de chaque souris, à raison de $2,22 \times 10^5$ par puits, furent stimulés en triplicata avec LPS ($50 \mu\text{g/mL}$), ConA ($1 \mu\text{g/mL}$) ou un anticorps anti-TcR H57 ($1 \mu\text{g/mL}$). Les plaques furent ensuite incubées pour une durée de 66h. $50 \mu\text{L}$ de surnageant sont ensuite prélevés dans les cultures cellulaires, on y ajoute un volume équivalent de réactif de Greiss (1% sulphanilamide, 0,1% *N*-naphtylethylenediamine dihydrochloride, 2,5% H_3PO_4). L'absorbance est lue à 550nm à l'aide d'un lecteur automatisé de plaques puis la concentration de nitrite est estimée selon la courbe standard de nitrite. * $P < 0,005$ Brûlées faible en gras vs contrôle faible en gras et $P < 0,005$ Brûlées faible en gras vs brûlées chow, ** $P < 0,05$ Brûlées faible en gras vs contrôle faible en gras et $P < 0,05$ Brûlées faible en gras vs brûlées chow, *** $P < 0,005$ Brûlées faible en gras vs contrôle faible en gras et $P < 0,01$ Brûlées faible en gras vs brûlées chow.

4. Évaluation de la résistance à l'infection par LPS selon la diète administrée

Expérience préliminaire

Nous avons procédé en premier lieu à une expérience préliminaire destinée à évaluer la quantité de LPS nécessaire à injecter aux souris pour provoquer une réaction inflammatoire qui serait assez importante pour tuer les souris brûlées qui reçoivent une diète standard, tout en étant assez faible pour épargner les souris contrôles, recevant la même diète, mais qui n'ont pas subi de véritable brûlure.

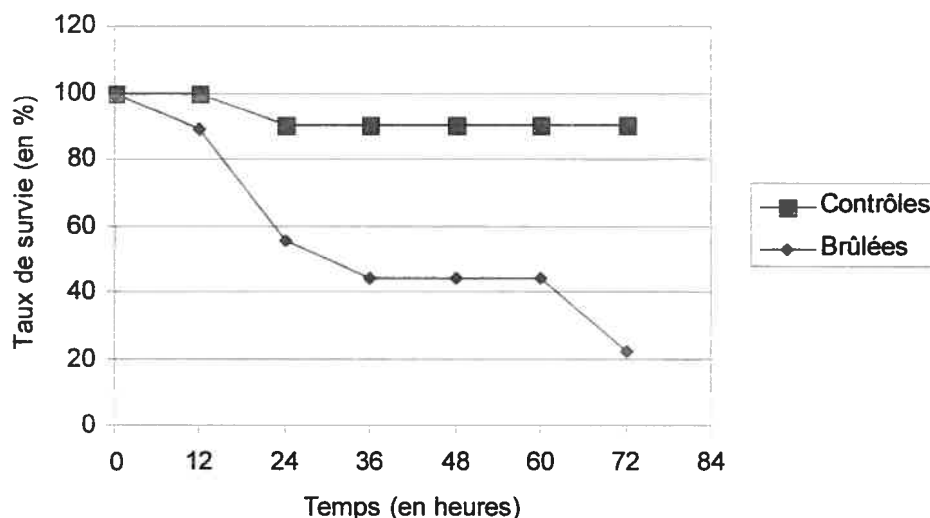


Figure 7 : Taux de survie selon le temps après injection intra-péritonéale de 250µg de LPS (*E. Coli* 0111:B4) chez des souris brûlées ou non brûlées recevant une diète chow standard à 5% de gras, 10 jours après la brûlure ou « fausse » brûlure pour le groupe contrôle (n=9 dans le cas des souris brûlées et n=10 pour les contrôles).

Nous avons 3 doses croissantes de LPS à tester sur les souris, 150µg, 250µg et 500µg. Des expériences précédentes utilisant la même souche de souris que dans notre étude (83)

et le même type de LPS, ont déterminé qu'une dose de 100µg résultait en un taux de survie de 100% alors qu'une dose de 500µg induisait un taux de mortalité de 100% chez des souris non brûlées. D'après ces données et selon les recommandations du comité d'éthique en santé animale, nous avons commencé avec une dose de 250µg de LPS.

Après 24h post injection de LPS, 90% des souris contrôles étaient encore en vie contre 56% chez les souris brûlées. Après un total de 72h, aucun autre décès ne fût recensé chez les souris contrôles mais seulement 22% des souris brûlées étaient encore en vie. Passé 72 heures post injection, les souris des deux groupes présentaient des signes d'amélioration (disparition de décharge oculaire, activité accrue, poil lisse et meilleure posture) et aucun décès ne fût compté après cette période.

Cette expérience souligne les effets délétères que peut exercer la brûlure sur le système immunitaire, conduisant au développement d'un état d'immunosuppression qui empêche les souris brûlées de déployer une réponse immunitaire adéquate pour répondre à la réaction inflammatoire induite par le LPS. Ceci illustre par la même occasion, contrairement aux résultats obtenus dans les séries d'expériences précédentes, que la diète chow standard (5% de gras) n'accorde aucune protection aux souris brûlées et ne permet pas de contrer l'immunodéficience engendrée par la brûlure.

Cette dose de 250µg de LPS ayant induit la mort des souris brûlées tout en préservant 90% des souris du groupe contrôle, nous avons utilisé la même quantité pour l'expérience suivante, mettant en jeu cette fois le paramètre de la diète faible en lipides.

Effet de la diète faible en gras après injection de LPS

Similairement au premier volet de notre étude, les souris ainsi que la nourriture de chaque cage furent pesées chaque jour afin d'observer si la quantité de lipides contenus dans la diète ou la brûlure affectent la consommation de nourriture et donc le statut nutritionnel de l'animal ainsi que sa croissance, pouvant éventuellement influencer des altérations d'ordre immunitaire et de ce fait la réponse à l'infection au LPS.

Nous remarquons dans ce cas que si les apports caloriques des souris ayant reçu la diète faible en gras reflètent l'état d'hypermétabolisme des animaux brûlés, les souris ayant reçu la diète standard présentent en revanche un faible apport comparé notamment aux groupes contrôles (tableau VII). Les cages et les quantités de nourritures et d'eau ayant été inspectées chaque jour, ceci ne peut être dû à un apport de nourriture déficient mais lié au comportement des animaux. On peut supposer que ce groupe a éventuellement été plus affecté par la brûlure et a réduit son apport après les manipulations chirurgicales et la brûlure le jour de l'expérience. La perte de poids moyenne subite par ce groupe (tableau VIII) demeure toutefois inférieure à celle du groupe de souris brûlées alimentée avec la diète faible en gras. Il est possible que l'état d'hypermétabolisme ait été moins marqué dans l'ensemble chez le groupe des souris brûlées nourries avec la diète standard, ce qui expliquerait leur apport calorique moins important et la perte de poids moins marquée.

Après 24h suivant l'injection de LPS, 90% et 80% des souris appartenant aux groupes contrôles avec la diète faible en gras ou standard respectivement étaient encore en vie contre un taux de survie de 30% chez les souris brûlées, toutes diètes confondues. Ceci démontre l'effet de la brûlure au niveau du système immunitaire et la perte de résistance contre les infections. Toutefois, le taux de survie similaire chez les deux groupes implique que la brûlure a eu le même effet délétère quelque soit la diète administrée (1% ou 5 % de gras) au préalable.

Après 48h, aucun décès supplémentaire ne fût recensé chez les souris contrôles 1% mais on observait un taux de survie de seulement 60% chez les souris contrôles recevant la diète standard. Le taux de survie élevé du groupe contrôle recevant la diète faible en gras exclu l'hypothèse que la dose de LPS est trop élevée et conduit à la mort des contrôles, si tel était son effet on aurait du observer une tendance similaire chez les deux groupes contrôles. Les deux groupes de souris brûlées montrent un taux de survie de 20%, ce qui empêche donc d'attribuer un quelconque effet protecteur venant de la diète faible en gras. Idéalement, les deux groupes contrôles et le groupe de souris brûlées recevant la diète

faible en lipides auraient du présenter des taux de survie élevés contre un taux minimum concernant les souris auxquelles l'on a administré la diète standard.

D'après les résultats de cet autre volet de notre étude, nous ne pouvons associer l'administration d'une diète faible en lipides à une immunodéficience moins prononcée ou à un quelconque effet protecteur au niveau du système immunitaire vis à vis d'une diète plus riches en acides gras.

Tableau VII : Apport alimentaire cumulé au cours de 10 jours pour chaque groupe avant injection de LPS (avec entre parenthèses l'apport calorique par jour pour 10 souris en kcal/jour). Les groupes, reçurent une même diète pendant les 10 jours consécutifs de l'expérience.

| | DIÈTES en g (kcal/jour) | |
|-----------------------|-------------------------|--------------------|
| | Faible en gras (1%) | Chow Standard (5%) |
| Contrôles chow (n=10) | - | 296,6 (98) |
| Brûlées chow (n=10) | - | 247,4 (82) |
| Contrôles 1% (n=10) | 313,9 (114) | - |
| Brûlées 1% (n=10) | 352,3 (128) | - |

Tableau VIII : Variation de poids moyenne des souris par groupe entre le jour de la brûlure et le jour de l'injection de LPS (10^{ème} jour). Les groupes reçurent une même diète, 1% ou 5% de gras selon leur groupe, pendant les 10 jours de l'expérience.

| | Variation du poids (en g) | |
|------------------------|---------------------------|--------------------|
| | Faible en gras (1%) | Chow Standard (5%) |
| Contrôles chow (n=10) | - | 1,28 ± 0,51 |
| Brûlées chow (n=10) | - | -0,79 ± 1,03 |
| Contrôles 1% (n=10) | 1,34 ± 0,96 | - |
| Brûlées Jour 10 (n=10) | -1,00 ± 0,72 | - |

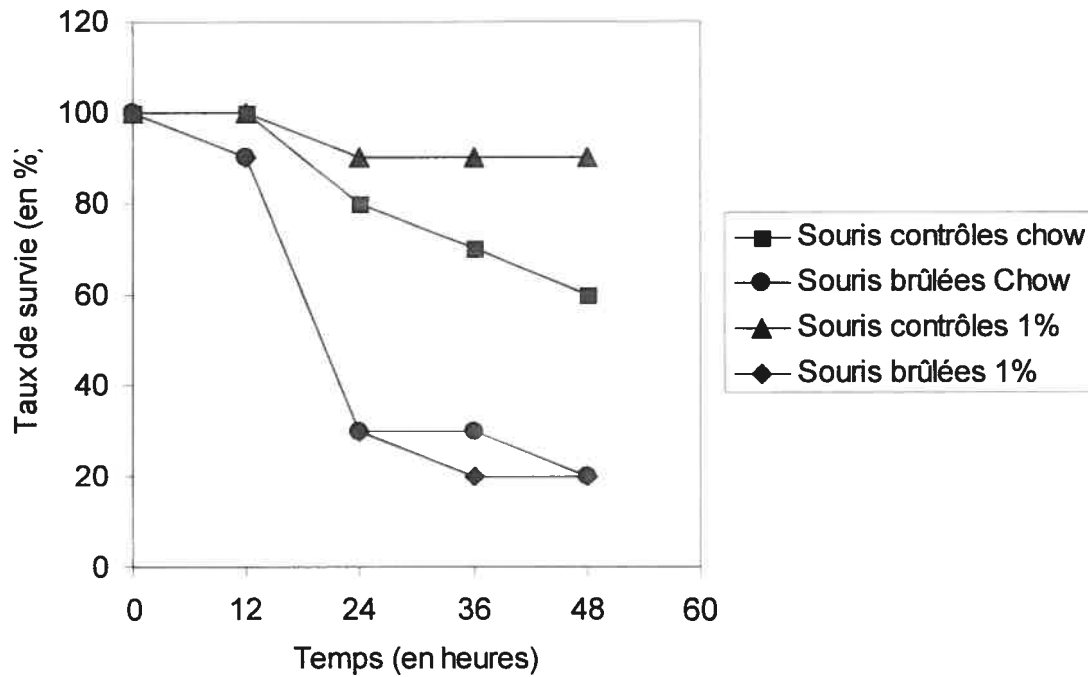


Figure 8 : Taux de survie selon le temps après injection intra-péritonéale de 250 μ g de LPS (E. Coli 0111:B4) chez des souris brûlées ou non brûlées recevant une diète chow standard à 5% de gras ou une diète faible en gras (1%), 10 jours après la brûlure ou « fausse » brûlure pour le groupe contrôle (n=10). La différence entre les groupes Contrôles chow et Contrôles 1% n'est pas significative.

V. DISCUSSION

Des études antérieures au sein de notre laboratoire ont permis de mettre en avant les effets bénéfiques d'une diète basse en lipides sur divers paramètres après une brûlure grave. Un support nutritionnel administré à des patients dont la teneur en gras n'excédait pas 15% des calories totales a permis de réduire de manière significative le temps d'hospitalisation ainsi que les risques d'infections (28), associé à un meilleur statut nutritionnel global couplé à un meilleur statut respiratoire. Suite à cette étude portant sur des humains, une autre étude réalisée à l'aide d'un modèle animal, la souris, s'est penchée sur l'administration d'une diète faible en gras et son effet sur la prolifération des splénocytes et le stress oxydatif suite à une brûlure grave, comparé à une diète plus riche en gras. (8) Cette étude avait contribué à souligner les avantages d'une alimentation faible en lipides après une brûlure, pendant 4 ou 10 jours, en démontrant ses effets contre l'inhibition de la prolifération des splénocytes *in vitro* ainsi que la réduction du stress oxydatif engendré par la brûlure. Cette normalisation de la prolifération, indiquant ainsi l'absence ou réduction de l'état d'immunosuppression en ce qui a trait aux cellules T, était associée à une production inférieure de NO, médiateur qui jouerait un rôle dans l'induction de l'immunosuppression après une brûlure.

En se basant sur cette étude et les résultats obtenus, nous avons voulu tenter de déterminer la période minimale requise à la diète faible en lipides après la brûlure pour exercer son action bénéfique sur l'état d'immunosuppression ainsi que le stress oxydatif qui accompagne les blessures thermiques. Déterminer la durée au cours de laquelle l'organisme doit recevoir la diète pour en observer les effets pourrait éventuellement nous suggérer un potentiel mécanisme d'action de celle-ci. Si la diète démontre des effets durables après avoir été administrée sur une courte période, il serait probable qu'elle agisse au niveau de la barrière intestinale ou agisse rapidement contre l'immunosuppression affectant les cellules T après 4 jours post brûlure. Si toutefois la diète doit être administrée en permanence sur une plus longue période, un mécanisme d'action à l'échelle de l'organisme pourrait être envisagé.

Nous avons donc administré une diète faible en lipides à des souris brûlées pour des périodes variant de 4 à 10 jours. À partir de 4 jours post-brûlure, ceci correspondant au

moment où une réduction dans la réponse proliférative des splénocytes a été observée chez des souris brûlées alimentées par une diète régulière. (13) Puis 10 jours étant le moment où l'inhibition a été la plus importante pour la prolifération des cellules T. (13) Les souris étaient nourries pendant 4 à 10 jours selon leur groupe avec la diète à 1% de lipides à quoi succédait la diète chow standard à 5% de lipides pour le reste de la durée de l'expérience. À priori, si l'administration de la diète pendant une certaine période est suffisante pour exercer les effets positifs, les périodes d'administration supérieures auraient également du présenter une prolifération normale des cellules.

Les résultats obtenus lors de notre étude ne coïncident toutefois pas avec nos attentes ou ne présentent pas de tendance particulières quant à la période minimale requise d'administration de la diète et ne nous permettent pas d'élaborer d'hypothèses quant à de possibles mécanismes d'actions. La prolifération des splénocytes stimulés par différents mitogènes ne nous a pas fournies de résultats constants quant au taux de prolifération des cellules selon la diète administrée. La première série d'expériences (figure 1) semble démontrer un effet positif de la diète faible en lipides sur la prolifération des lymphocytes T en réponse à l'activation par un mitogène spécifique H57. La réponse au mitogène LPS visant les lymphocytes B est nettement inhibée tandis que la réponse à ConA, un mitogène polyclonal stimulant les lymphocytes T également, n'est normale que pour les jours 4, 5 et 7. La seconde série d'expériences en revanche (figure 3) ne fait état que de deux groupes pour lesquels la prolifération en réponse à ConA est inhibée et un seul dans le cas de la stimulation au LPS. La réponse à H57 est fortement diminuée dans le cas de 4 groupes sur 7, par rapport au groupe contrôle d'une part ainsi que par rapport au groupe de souris brûlées qui recevaient une autre diète. Ces derniers résultats confirment l'effet néfaste de la brûlure sur la prolifération des lymphocytes T, mais suggèrent également que la diète n'a pas eu d'effet, voire que la diète à teneur plus élevée en gras aurait eu un avantage quant à la prévention du développement d'état d'immunosuppression.

Il est aussi surprenant de constater dans le cas de la seconde série d'expériences (figure 3), que des groupes présentant une inhibition de la prolifération (J5 et J6 ou J5 dans les figures 3A et 3B respectivement) sont flanqués de groupes dont la prolifération s'avère

normale. Si la diète exerce un effet bénéfique après avoir été administrée seulement sur une période de 4 jours, il serait a priori normal de s'attendre à une prolifération normale pour des groupes dont la diète a été administrée plus longtemps puisque d'après l'étude sur laquelle nous nous basons (8), une alimentation sur 10 jours avec la diète n'avait pas d'effets néfastes quant à la prolifération des splénocytes.

De plus, hormis lors de notre série d'expériences dites contrôle (figure 2), nous n'avons pu observer l'inhibition de la prolifération des cellules issues de groupes de souris brûlées dont la diète contenait 5% de lipides. Cette absence d'immunosuppression sans support nutritionnel sous forme de diète faible en lipides (1% dans ce cas), ne peut nous permettre d'associer de façon certaine la prolifération normale observée dans les groupes J4 à J10 selon les stimuli (figures 1 et 3) à l'administration de la diète. Pour observer ses effets et conclure quant à son action au niveau du système immunitaire, il aurait été nécessaire d'observer une prolifération significativement inhibée chez les groupes de souris brûlées qui n'ont pas reçu de support nutritionnel particulier.

Parallèlement à l'observation de la prolifération des lymphocytes selon la diète administrée, nous avons mesurée la production de NO par les cellules afin de déterminer une éventuelle relation entre la libération de ce médiateur immunosuppresseur et l'inhibition de la prolifération. La production de NO observée était normale comparée aux contrôles lors de la première série d'expérience (figure 4) ainsi que lors de la seconde (figure 6) hormis pour les groupes J8 à J10. Hors cette production significative de NO ne corrèle pas avec une inhibition de la prolifération si ce n'est pour le groupe J9 après stimulation par H57 (figure 6C). L'inhibition de la prolifération des lymphocytes observée au cours de l'étude ne serait donc pas causée par une augmentation de la production de NO, et inversement, une augmentation de la production de NO n'a pas supprimée la prolifération des lymphocytes.

Un autre volet de l'étude, qui se penchait aussi sur les avantages d'une diète faible en lipides contre l'immunosuppression après la brûlure et ainsi contre les infections qui en découlent, consistait à administrer deux diètes différentes (1% et 5% de lipides) à des

souris brûlées et non brûlées (en guise de contrôles) sur une période de 10 jours. Au jour 10 après la brûlure, une dose de 250 μ g ip de LPS était injectée aux souris afin d'observer l'éventuel effet protecteur de la diète plus faible en lipides. Si cette dernière est bénéfique quant à l'état d'immunosuppression qui se manifeste après une brûlure, elle permettrait donc au système immunitaire de déclencher une réaction appropriée afin de résister contre l'infection induite par l'injection de LPS. Si la diète est bel et bien protectrice, un taux de survie comparable à celui des groupes contrôles devrait donc être observé. L'administration de LPS bactérien conduit à l'activation de plusieurs composants du système immunitaire tels les macrophages et monocytes ou encore les cellules endothéliales et épithéliales, via le toll-like receptor 4 (TLR4). Leur activation induit la production de cytokines pro et anti-inflammatoires, qui vont finalement engendrer une réaction inflammatoire. L'injection de LPS chez les souris nous permet de déterminer leur résistance ou susceptibilité à cet élément des membranes bactériennes suivant les diètes administrées.

Cette procédure a confirmé les effets néfastes de la brûlure au niveau du système immunitaire et de la résistance appauvrie aux infections qu'elle induit. Le taux de survie chez les souris brûlées après seulement 48h était de 20% contre 60% et 90% pour les contrôles ayant reçu la diète chow et la diète faible en lipides respectivement. En revanche, il s'avère que les deux groupes de souris brûlées, toutes diètes confondues, obtiennent le même taux de survie après 48h, ce qui nous indique que la diète dans ce cas n'a pas permis de contrer l'immunosuppression suffisamment pour induire une réponse adéquate après l'infection déclenchée par le LPS. Ceci coïncide avec les observations faites lors du premier volet de cette étude. Le taux de survie de seulement 60% chez les souris contrôles nourries à la diète standard laisse présumer qu'une plus faible dose de LPS aurait dû être employée. Hors, lors d'un essai précédent d'injection de LPS chez des souris brûlées et contrôles (données non montrées), cette même dose a abouti à un taux de survie presque maximal pour tous les groupes confondus, même dans le cas des souris brûlées. Les données de cette étude ne sont pas mentionnées ici compte tenu du manque de cohérence des résultats. De plus un épisode d'infection dans les facilités dans lesquelles sont hébergés nos animaux nous a contraint à prendre des précautions

particulières et à minimiser le déplacement et le contact avec les animaux. Les procédures ayant été quelque peu différentes et ceci associé aux résultats incohérent nous n'avons pas tenu compte de cette expérience. Toutefois, le fait que les souris brûlées aient pu résister à l'infection par le LPS montre qu'une dose plus faible pour épargner toutes les souris contrôles aurait probablement eu pour effet de ne pas affecter les souris brûlées.

Ce projet a été réalisé en se basant entièrement sur le protocole suivi lors de l'étude de Jobin & al (8) qui avait démontré les avantages au niveau du système immunitaire de l'administration d'une diète faible en lipides après une brûlure grave. Les procédures furent les mêmes ainsi que la même lignée de souris, qui furent hébergées dans les mêmes facilités, donc dans des conditions semblables. La seule différence notable dans la réalisation de ce protocole serait la diète standard chow à 5% de lipides fournie par l'animalerie, qui a changé entre le moment où la précédente étude fût menée et notre projet. La comparaison des compositions des deux diètes (dont les formules sont fournies en annexe) fait état de certains écarts importants concernant quelques nutriments. La déficience, même modérée, d'un seul nutriment peut résulter en une réponse immunitaire altérée, donc la présence accrue ou une diminution d'un ou de plusieurs nutriments en particulier aurait pu éventuellement influencer la réponse des splénocytes lors du premier projet, en terme d'inhibition, ou bien aurait eu au contraire des effets bénéfiques inattendus sur le système immunitaire lors de notre étude.

Lors d'infections, le stress oxydatif est empiré dans le cas de déficience en micronutriments. (75) Des micronutriments comme la vitamine A, l'acide folique et la vitamine B12 ont des fonctions immunomodulatrices et peuvent donc influencer sur la sensibilité aux infections ainsi que sur l'issue de ces infections. (75) Des déficiences en vitamine B12, vitamine B6, folate ou niacine peuvent engendrer des bris de l'ADN ou des lésions oxydatives. (75) Une altération de la diète et donc des apports nutritionnels pourraient avoir un impact sur l'immunosuppression et ainsi la prolifération des lymphocytes.

Chez l'humain, une déficience en iode peut induire un retard mental au cours de l'enfance, et causer à tout âge un goitre ou de l'hypothyroïdisme. La diète à 5% de gras utilisée lors de l'étude antérieure affiche une teneur en iode de 0.5 mg/Kg contre 11.55 mg/Kg dans la diète que nous avons utilisé lors de notre étude. L'hypothyroïdisme engendré par une déficience en iode pourrait altérer la fonction des lymphocytes. On pourrait donc supposer qu'une certaine carence en iode aurait pu déclencher un état d'hypothyroïdisme suffisamment subtil pour ne pas induire le développement de goitre et donc resté inaperçu d'un point de vue clinique mais être assez soutenu pour altérer d'autant plus la réponse des lymphocytes et expliquer la prolifération inhibée dans le cas des souris brûlées qui recevait cette diète. Hors la diète faible en gras contient une teneur en iode similaire à l'ancienne diète 5%, et si la prolifération normale des lymphocytes dans notre étude n'est pas constante selon les groupes, certains démontrent tout de même une prolifération adéquate, ce qui minimise donc la possibilité que la différence de teneur en iode soit à l'origine des différences observées au cours des deux projets.

La thiamine joue un rôle important dans la fonction nerveuse et dans la libération de neurotransmetteurs. Elle joue un rôle dans le métabolisme des glucides et constitue un nutriment essentiel pour libérer l'énergie de la nourriture. Une déficience conduit en premier lieu à une perte de poids, suivie de changements de comportements comme l'apathie. Une surdose est peu probable compte tenu de sa faible toxicité relative. Elle ne constitue pas un micronutriment majeur dans le bon fonctionnement du système immunitaire. La diète actuelle compte 16.5 mg/Kg de thiamine contre 80 mg/Kg lors de la précédente étude, on ne peut donc attribuer une inhibition de la prolifération lors de cette dernière à une déficience en thiamine compte tenu des résultats obtenus avec une dose près de 5 fois inférieure. Il est également peu probable qu'une plus faible quantité de ce nutriment ait pu contribuer à une meilleure prolifération des splénocytes.

La nouvelle diète contient 41.2 mg/Kg de niacine contre 98 mg/Kg pour l'ancienne diète. Cet élément, dont les formes actives physiologiquement sont le nicotinamide-adenosine-dinucléotide (NAD) et le nicotinamide-adenine-dinucléotide-phosphate (NADP), joue un rôle essentiel au niveau des réactions d'oxydoréduction dans le mécanisme de la

respiration cellulaire. Chez l'humain, une dose orale ponctuelle peut engendrer un phénomène de vasodilatation médiée par les prostaglandines. On peut émettre l'hypothèse qu'une teneur plus élevée en niacine aurait pu influencer sur la libération des prostaglandines et de ce fait contribuer à maintenir l'état d'immunosuppression avec la diète chow précédente.

L'acide folique joue un rôle dans la synthèse du matériel génétique et contribue à maintenir les systèmes nerveux, immunitaire et digestif en bonne santé. Les conditions qui induisent une augmentation de la réplication des cellules, comme la croissance tissulaire, ainsi que le taux métabolique, comme une infection, contribuent à accroître les besoins en folate. La diète antérieure contenait 8mg/Kg d'acide folique contre 3.34 mg/Kg dans la nouvelle diète. Si une prolifération normale des lymphocytes est observée dans le groupe de souris brûlées recevant cet apport en acide folique, une quelconque carence en ce nutriment pouvant expliquer les résultats antérieurs est à exclure.

Enfin, on constate une teneur deux fois plus élevée en pyridoxine dans la diète actuelle (18.5 mg/Kg contre 9 mg/Kg précédemment). La vitamine B₆ est un nutriment indispensable à la synthèse des anticorps, des lymphocytes et de l'hémoglobine. Elle joue également un rôle dans le métabolisme des phospholipides et contribue au maintien de la santé du système immunitaire. Une réduction de l'apport en pyridoxine pourrait éventuellement contribuer à l'altération de la réponse des lymphocytes après une brûlure

Les micronutriments sont nécessaires pour le déroulement de réactions biochimiques en tant que coenzymes et cofacteurs et leur carence peut compromettre l'absorption et l'utilisation adéquate de l'énergie apportée par la diète. Si les besoins en micronutriments ne sont pas encore bien connus dans le cas des grands brûlés, on peut supposer qu'ils sont supérieurs aux apports recommandés pour une personne en bonne santé étant donné les phénomènes d'hypermétabolisme et d'immunosuppression qui font suite à la brûlure. Il serait toutefois délicat d'extrapoler les besoins en micronutriments chez les souris brûlées. D'après la comparaison de l'ancienne diète et de la nouvelle, nous pouvons

soulever des hypothèses quant à un éventuel rôle d'une déficience ou d'un apport accru de certains micronutriments dans la réponse immunitaire après une brûlure. Toutefois nous ne pouvons être assuré de la vérité de ces hypothèses avant que de plus amples études spécifiques sur ce sujet ne soit menées. De plus, les résultats de l'expérience contrôle aboutissent à une inhibition de la prolifération des splénocytes issus du groupe de souris brûlées qui ont reçu la diète standard. Si ces différences ont eu un quelconque impact sur la prolifération des cellules, l'effet aurait du vraisemblablement s'exercer idéalement lors de chaque série d'expériences. De plus, les souris appartenant à l'étude de la cinétique avec la diète 1% ont toutes reçu, sauf le groupe J10, la diète chow à 5% de gras au cours d'une période plus ou moins prolongée. Si celle-ci exerce un certain effet sur la prolifération des cellules qui expliquerait les différences entre notre étude et la précédente, elle aurait du contribuer à l'augmentation de la prolifération chez les groupes recevant la diète 1% puis celle à 5%. Hors les résultats font état d'une inhibition de la prolifération pour certains de ces groupes, dont certains d'entre eux ayant reçu la diète 5% pour une période supérieure à l'administration de la diète faible en lipides (J4, figure 3C.). Si la nouvelle composition de la diète chow a un réel impact sur le système immunitaire et l'immunosuppression elle aurait dû de ce fait contribuer à une meilleure réponse pour chaque groupe de souris brûlées à qui été administré la diète, ce qui n'est pas le cas. Nous ne pouvons donc associer les différences observées à la différence de composition des diètes utilisées.

Lors de la précédente étude réalisée sur le sujet, les souris contrôles non-brûlées reçurent également de la buprénorphine. Ceci ne fût pas le cas dans notre projet car il fût démontré que cette substance n'altérait pas les fonctions immunitaires et n'était donc pas susceptible de créer de différences notoires entre les brûlées recevant de la buprénorphine et les contrôles qui en sont dépourvues. (8) De plus, la chirurgie subite par les souris contrôles aurait pu exercer un effet immunomodulateur et induire une altération des résultats quant aux paramètres immunologiques et affecter le point de comparaison que représentent les groupes contrôles. Ayant utilisé un index de prolifération pour estimer la réponse des cellules à la stimulation par des mitogènes, et n'associant donc pas directement le résultat de la prolifération des groupes contrôles comme il fût fait dans la

précédente étude qui étudiait le rapport, l'absence de buprénorphine administrée au contrôle ne peut être une raison des résultats obtenus.

Dans le cas des souris brûlées recevant la diète à 5% de gras, nous pouvons aussi invalider l'hypothèse comme quoi la brûlure n'aurait pas été suffisamment profonde comparée au groupe de l'expérience contrôle, dont la prolifération est inhibée, puisque l'examen quotidien des animaux a permis de déceler la formation d'une croûte à l'endroit de la brûlure, globalement similaire chez tous les animaux. Si une telle brûlure a permis d'engendrer un état d'immunosuppression chez les souris brûlées des groupes nourries à la diète 1%, il n'y a pas de raison de croire qu'il n'en aurait pas été de même chez les souris appartenant au groupe 5%.

Les résultats obtenus au cours des deux expériences de la cinétique d'action de la diète faible en lipides nous laissent difficilement conclure quant à la période requise pendant laquelle la diète devrait être administrée pour exercer un effet bénéfique sur l'immunosuppression et la prolifération cellulaire après une brûlure.

Premièrement nous ne sommes pas parvenus à démontrer que la diète apportait un réel avantage vis-à-vis d'une diète régulière plus riche en gras. Si la prolifération des lymphocytes T stimulés par le mitogène H57 était normale dans le cas de la première série d'expérience (sauf dans le cas du groupe J10; figure 1C), elle était significativement inhibée lors de l'expérience contrôle (figure 2C) et de la seconde série d'expériences (figure 3C). Les mêmes résultats contradictoires s'observent dans le cas de la prolifération après stimulation avec le mitogène LPS qui, significativement inhibée pour tous les groupes de souris brûlées ayant reçu la diète faible en gras lors de la première série d'expérience (figure 1A), est en revanche normale hormis dans le cas de deux groupes pour la seconde série d'expériences ainsi que l'expérience réalisée à titre de contrôle (figures 3A et 2A respectivement). Un phénomène comparable s'observe dans le cas de la stimulation par ConA, inhibition significative de la prolifération pour 4 des 7

groupes de la cinétique lors de la première expérience (figure 1B) ainsi que la série contrôle (figure 2B), mais prolifération normale hormis pour un groupe dans le cas de la seconde série. Les résultats ne concordent pas d'une part, mais même en ne se basant que sur une série d'expériences on ne peut déterminer une logique dans le possible mécanisme d'action de la diète. La prolifération des lymphocytes T stimulée par H57 (figure 3C) n'est normale qu'à compter du groupe J7. En admettant qu'il faille compter cette période de 7 jours pour que la diète exerce son effet bénéfique et le maintienne au-delà sans pour autant continuer d'administrer cette diète, les groupes suivant, à savoir la diète administrée sur une période de 8 jours ou plus, devrait donc avoir un effet comparable. Mais, si J8 et J10 démontrent une prolifération normale, J9 est significativement inhibé. Il n'est donc possible d'émettre de conclusion quant à la cinétique d'action de la diète basée sur ces résultats.

Deuxièmement, le problème majeur rencontré au cours de ces deux séries d'expériences, est la prolifération normale qui est obtenue de la part des souris brûlées qui n'ont pas bénéficié de support nutritionnel. Quand bien même une certaine tendance concernant la cinétique d'action aurait pu être observée, il n'aurait été possible de conclure quant au rôle de la diète faible en lipides d'après les résultats de prolifération obtenus si à l'inverse l'administration d'une diète plus riche en gras ne présente pas d'inhibition marquée.

La suppression de la prolifération des lymphocytes T dépend de la présence de macrophages dans la population des splénocytes. (20) L'absence d'inhibition de la prolifération des lymphocytes T pour le groupe des souris brûlées nourries à la diète standard aurait pu peut-être être liée à une présence insuffisante de macrophages. De plus, le dosage de NO (figures 4 et 6), médiateur libéré par les macrophages, de ce groupe lors des deux séries d'expériences présente une production comparable aux contrôles, donc non exacerbée par la brûlure. Cette faible production de NO pourrait illustrer une présence diminuée de macrophages dans la préparation ce qui pourrait éventuellement être à l'origine de la prolifération normale des lymphocytes T. La stimulation avec ConA, mitogène qui cible les lymphocytes T ainsi que les macrophages, fait état d'une prolifération normale vis-à-vis des contrôles (figures 1B et 3B). Etant

donné que la stimulation par les mitogènes LPS et H57 de ce groupe résultent en une prolifération normale (figures 1A, C et 3A, C), on ne pourrait peut être pas détecter d'anomalie concernant la quantité de macrophages présents dans la préparation cellulaire et expliquerait les résultats de la prolifération avec ConA.

Les résultats obtenus lors du premier volet du projet, à savoir une prolifération des lymphocytes normale chez la souris brûlée dépourvue de support nutritionnel adéquat et une prolifération inhibée chez la souris brûlée qui a reçu une diète à 1% de gras, auraient pu être éventuellement liés à l'impact de la culture cellulaire *in vitro* qui ne résulte pas nécessairement en des résultats illustrant un phénomène *in vivo*. Ceci pourrait être une explication quant aux groupes de souris brûlées nourries avec la diète 5% puisque lors de l'expérience avec injection de LPS, ces souris ont connu un faible taux de survie à l'infection déclenchée par cette substance. Si les résultats *in vitro* contredisent ce fait, les résultats *in vivo* en revanche évoquent qu'aucune stimulation bénéfique particulière du système immunitaire n'est engendrée par la diète faible en gras. Mais dans le cas des souris recevant la diète à 1% de gras, l'infection engendrée par l'injection de LPS induit un taux de survie similaire à celui du groupe qui ne recevait pas une diète faible en lipides. La diète ne semble donc pas avoir contrée cet état d'immunosuppression qui se déclenche après une brûlure grave, ce qui correspond aux résultats observés avec certains groupes lors du premier volet de l'étude.

Une autre hypothèse pourrait être reliée aux méthodes de laboratoires employées. Nous avons eu recours à du sérum fœtal bovin inactivé (FBS) lors de cette étude comme il fût le cas précédemment (8). Toutefois il aurait probablement été souhaitable d'avoir recours à la place à du sérum autologue de souris non-brûlées afin de minimiser les interférences. L'utilisation de sérum de souris brûlées contre celui de souris non-brûlées a été observé lors d'une précédente étude au sein de notre laboratoire (81), le sérum de souris brûlées présentant des caractéristiques immunosuppressives, le recours à du sérum de souris non brûlées est recommandé. Le FBS est un média qui permet la croissance cellulaire *in vitro*. Il peut en revanche contenir des substances, et notamment des lipides, qui viendraient altérer les résultats dans le cas de réponses spécifiques attendues. Yaqoob et al (85) ont

comparé les effets de diètes différant de part leur composition en lipides sur la prolifération des lymphocytes chez le rat. Les cellules furent stimulées par ConA en présence de FBS ou de sérum autologue. Il en ressort qu'indépendamment de la teneur et nature en lipide de la diète administrée, la prolifération en présence de sérum autologue est beaucoup plus importante que celle en présence de FBS. Les lipides contenus dans le sérum fœtal bovin viendraient altérer la composition en acides gras des lymphocytes et ainsi masquer la réponse induite par l'administration d'une diète faible en gras.

La précédente étude à laquelle notre projet fait suite présentait pourtant une prolifération adéquate dans le cas des souris alimentée à la diète faible en gras, et ce en dépit de l'utilisation de FBS. Peut-être que la nature exacte du FBS peut varier légèrement et contenir une quantité variable de lipides qui auraient pu altérer la réponse lors de notre étude. Les expériences suivantes bénéficieraient sans doute de l'utilisation de sérum murin au lieu de sérum bovin.

VI. CONCLUSION

Notre projet visait à étudier l'impact d'une diète faible en gras sur l'immunosuppression après une brûlure grave et de manière connexe, à évaluer les délais nécessaires à une telle diète pour exercer ses effets bénéfiques sur le système immunitaire. Contrairement à ce qu'il fût mentionné précédemment dans la littérature, nous n'aboutissons pas à un effet marqué de la diète quant à la prolifération des splénocytes et plus particulièrement des lymphocytes T, population la plus sévèrement touchée par l'état d'immunosuppression. Le principal obstacle rencontré lors de ce projet et qui nous empêche de conclure quant à l'action de la diète, réside dans la prolifération normale des cellules issues de groupes de souris qui n'ont pas reçu de support nutritionnel particulier. Les expériences furent répétées à plusieurs reprises dans le but d'éradiquer une éventuelle erreur de manipulations mais les résultats persistent en ce sens. De même, l'injection de LPS chez des souris brûlées et non brûlées qui ont été soumises à des diètes différant selon leur composition en acides gras ne démontre aucun effet protecteur provenant de la diète faible en lipides. La littérature démontre toutefois que la quantité d'acides gras joue un rôle majeur dans la prévention de l'immunosuppression et de ce fait, des infections qui peuvent découler d'une brûlure sévère. De plus amples expériences devront être réalisées pour confirmer le rôle de la diète et déterminer son mécanisme d'action.

VII. BIBLIOGRAPHIES

1. Martin G. Schwacha, Irshad H. Chaudry. The cellular basis of post-burn immunosuppression: macrophages and mediators. *Int J Mol Med.* 10 (3):239-43, 2002
2. Rimdeika R, G.D., Adamonis K, Barauskas G, Pavalkis D, Endzinas Z., The effectiveness of caloric value of enteral nutrition in patients with major burns. *Burns*, 32(1): 83-88, 2006
3. J.A. Teodorczyk-Injeyan, B.G. Sparkes, G.B. Mills, W.J. Peters and R.E. Falk, Impairment of T cell activation in burn patients: a possible mechanism of thermal injury induced immunosuppression. *Clin. Exp. Immunol.* 65: 570–581, 1986.
4. J.R. Saffle, J.J. Sullivan, G.M. Tuohig and C.M. Larson. Multiple organ failure in patients with thermal injury. *Crit. Care Med.* 21: 1673–1683, 1993.
5. A.E. Baue, R. Durham and E. Faist, Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle? *Shock* 10: 79–89.
6. T.T. Nguyen, D.A. Gilpin, N.A. Meyer and D.N. Herndon. Current treatment of severely burned patients. *Ann. Surg.* 223: 14–25, 1996.
7. B.H. Harris and J.A. Gelfand. The immune response to trauma. *Semin. Pediatr. Surg.* 4: 77–82, 1995.
8. Jobin N, Garrel DR, Champoux J, Bernier J., Improved immune functions with administration of a low-fat diet in a burn animal model. *Cell Immunol* 206 (2):71-84, 2000
9. Montegut WJ, Lowry SF., Nutrition in burn patients. *Semin Nephrol.* 13(4):400-8, 1993
10. Alexander JW, Gottschlich MM., Nutritional immunomodulation in burn patients. *Crit Care Med.* 18 (2 Suppl):S149-53, 1990
11. Garrel DR, Davignon I, Lopez D., Length of care in patients with severe burns with or without early enteral nutritional support. A retrospective study. *J Burn Care Rehabil.* 12 (1):85-90, 1991
12. Chiarelli A, Enzi G, Casadei A, Baggio B, Valerio A, Mazzoleni F, Very early nutrition supplementation in burned patients. *Am J Clin Nutr.* 51(6):1035-9. 1990

13. Jobin N, Garrel D, Bernier J., Increased serum-soluble interleukin-2 receptor in burn patients: characterization and effects on the immune system. *Hum Immunol.*61 (3):233-46. 2000
14. William W. Monafo, M.D., Initial Management of Burn. *N. Engl. J. Med.* 335 (21): 1581-1586, 1996
15. Arturson G., Pathophysiology of the burn wound and pharmacological treatment. The Rudi Hermans Lecture, 1995. *Burns* 22 (4): 255-74, 1996
16. D Jackson and G Mac, The William Gissane Lecture 1982. The burn wound: its character, closure and complications. *Burns* 10: 1, 1983.
17. DeSanti L. Pathophysiology and current management of burn injury. *Adv Skin Wound Care.* 18 (6):323-32, 2005.
18. Zawacki B. Reversal of capillary stasis and prevention of necrosis in burns. *Ann Surg.* 180:98-102, 1974
19. Constable JD. The state of burn care: past, present and future. *Burns.* 20:316-324. 1994.
20. Michelle Alexander, Irshad H. Chaudry and Martin G. Schwacha. Relationships between burn size, immunosuppression, and macrophage hyperactivity in a murine model of thermal injury. *Cellular Immunology.* 220 (1): 63-69 2002.
21. Heideman M, Bengtsson A., The immunologic response to thermal injury. *World Journal of Surgery.* 16 (1): 53-56. 1992
22. Blok WL, K.M., van der Meer JW., Modulation of inflammation and cytokine production by dietary (n-3) fatty acids. *Journal of Nutrition.*, 126(6): 1515-33, 1996.
23. Harper R, Parkhouse N, Green C, Martin R, Nitric oxide production in burns: plasma nitrate levels are not increased in patients with minor thermal injuries. *J Trauma.* 43(3):467-74, 1997
24. Dennis C. Gore, Amanda Rinehart and Greg Asimakis, Temporal changes in cellular energy following burn injury. *Burns* 31(8): 998-1002, 2005
25. D.W. Wilmore, J.M. Long, A.D. Mason Jr., R.W. Skreen and B.A. Pruitt Jr., Catecholamines: mediator of the hypermetabolic response to thermal injury, *Ann Surg* 180: 653–669. 1974

26. W.G. Cioffi, D.G. Bureson and B.A. Pruitt, Jr, Leukocyte responses to injury. *Arch Surg* 128: 1260. 1993
27. G.M. Vaughan, R.A. Becker, J.P. Allen et al., Cortisol and corticotrophin in burned patients. *J Trauma* 22: 263, 1982
28. 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. *Journal of parenteral and enteral nutrition*. 19 (6): 482-491, 1995
29. A Luttherman, C.C. Dacso and P.W. Curreri, Infections in burn patients. *Am J Med* 81 suppl IA: 45, 1986
30. D.P. Mooney and R.L. Gamelli, Sepsis following thermal injury. *Comp Ther* 15: 22,1989
31. Basil A. Pruitt, Jr., Albert T. McManus, Seung H. Kim and Cleon W. Goodwin. Burn Wound Infections: Current Status. *World Journal of Surgery*. 22(2):135-146, 1998
32. Rohde, T, Maclean, D.A, Klarlund Pedersen, B. Glutamine, Lymphocyte Proliferation and Cytokine Production. *Scandinavian Journal of Immunology*. 44(6):648-652, 1996
33. A Beal and F.B. Cerra, Multiple organ failure syndrome in the 1990s. Systemic inflammatory response and organ dysfunction. *JAMA* 271:226, 1994.
34. C.J. Carrico, J.L. Meakins, J.C. Marshall et al., Multiple-organ failure syndrome. *Arch Surg* 121: 196, 1986
35. A Billiau and F Vandekerckhove, Cytokines and their interactions with other inflammatory mediators in the pathogenesis of sepsis and septic shock. *Eur J Clin Invest* 21: 559, 1991
36. Y Barlow, T lymphocytes and immunosuppression in the burned patient: a review. *Burns* 20: 487, 1994
37. Gray, D.T., Pine, R.W., Harnar, T.J., Marvin, J.A., Engrav, L.H., Hedback, D.T.: Early surgical excision versus conventional therapy in patients with 20 to 40 per cent burns. *Am. J. Surg.*144:76, 1982
38. Tompkins, R.G., Burke, J.F., Schoenfeld, D.A., Bondoc, C.C., Quinby, W.C. Jr., Behringer, G.C., Ackroyd, F.W.: Prompt eschar excision: A treatment system contributing reduced burn mortality. *Ann. Surg.*204:272, 1986

39. McManus, W.F., Mason, A.D. Jr., Pruitt, B.A. Jr.: Excision of the burn wound in patients with large burns. *Arch. Surg.*124:718, 1989
40. E.A. Deitch , The management of burns. *N. Engl. J. Med.* 323: 1249–1253. 1990
41. R.G. Tompkins, J.F. Burke, D.A. Schoenfeld, C.C. Bondoc, W.C. Quinby, Jr., G.C. Behringer et al., Prompt eschar excision: a treatment system contributing to reduced burn mortality. A statistical evaluation of burn care at the Massachusetts General Hospital (1974–1984). *Ann. Surg.* 204: 272–281, 1986
42. Schwacha MG. Macrophages and post-burn immune dysfunction. *Burns.*29(1):1-14, 2003
43. C.S. Hultman, B.A. Cairns, S. deSerres, J.A. Frelinger and A.A. Meyer , Early, complete burn wound excision partially restores cytotoxic T lymphocyte function. *Surgery* 118: 421–429, 1995.
44. H. Yamamoto, S. Siltharm, S. deSerres, C.S. Hultman and A.A. Meyer , Immediate burn wound excision restores antibody synthesis to bacterial antigen. *J. Surg. Res.* 63: 157–162, 1996
45. O. Cetinkale, K.M. Ulualp, F. Ayan, M. Duren, O. Cizmeci and A. Pusane , Early wound excision and skin grafting restores cellular immunity after severe burn trauma. *Br. J. Surg.* 80: 1296–1298.
46. Aller MA, Arias JL, Sanchez-Patan F, Arias J. The inflammatory response: An efficient way of life. *Med Sci Monit.* 12(10):RA225-234, 2006
47. Cunningham JJ. Factors contributing to increased energy expenditure in thermal injury: a review of studies employing indirect calorimetry. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 14(6):649-56, 1990
48. Carsin H, Bargues L, Stephanazzi J, Paris A, Aubert P, Le Bever H. Réaction inflammatoire et infection chez le brûlé grave. *Pathol Biol (Paris).* 50(2):93-101, 2002
49. John F. Hansbrough, Ramon Zapata-Sirvent, V. Peterson, X. Wang, Edward Bender, Henry Claman and John Boswick. Characterization of the immunosuppressive effect of burned tissue in an animal model. *Journal of Surgical Research.* 37(5): 383-95, 1984
50. Magnotti LJ, Deitch EA. Burns, bacterial translocation, gut barrier function, and failure. *J Burn Care Rehabil.* 26(5):383-91, 2005
51. Klein GL, Herndon DN. Burns. *Pediatr Rev.*25(12): 411-419, 2004

52. Deitch EA, Intestinal permeability is increased in burn patients shortly after injury. *Surgery*; 107:411-16, 1990
53. Ziegler TR, Smith RJ, Mitchell CJ, et al, Increased intestinal permeability associated with infection in burn patients. *Arch Surg*; 123:1313-9, 1988
54. Berg RD, Garlington AW, Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun*. 23:403-11, 1979
- 55.. Deitch EA, Maejima K, Berg RD. Effect of oral antibiotics and bacterial overgrowth on the translocation of the GI-tract microflora in burned rats. *J Trauma* 25:385-92, 1985.
56. Deitch EA. Multiple organ failure: pathophysiology and potential future therapies. *Ann Surg* 216:117-34, 1992.
57. Ryan CM, Yarmush ML, Burke JF, et al. Increased gut permeability early after burns correlates with the extent of burn injury. *Crit Care Med*. 20:1508-12, 1992
58. Deitch EA, Xu DZ, Franko L, et al. Evidence favoring the role of the gut as a cytokine generating organ in rats subjected to hemorrhagic shock. *Shock* 1:141-6, 1994
59. Maddaus MA, Wells CL, Platt JL, et al. Effect of T cell modulation on the translocation of bacteria from the gut and mesenteric lymph node. *Ann Surg* 207:387-98, 1988.
60. Ipaktchi K, Arbabi S. Advances in burn critical care. *Crit Care Med*. 34(9 Suppl): S239-44, 2006
61. Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 18(3):385-405, 2004.
62. Kohl BA, Deutschman CS. The inflammatory response to surgery and trauma. *Curr Opin Crit Care*. 12(4):325-32, 2006
63. Angele MK, Faist E. Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care*. 6(4):298-305. 2002
64. M.G. Schwacha and S.D. Somers, Thermal injury induced immunosuppression in mice: the role of macrophage derived reactive nitrogen intermediates. *J. Leukoc. Biol*. 63: 51-58, 1998

- 65.. R. Fukushima, J.W. Alexander, J.Z. Wu, J.X. Mao, K. Szczur, A.M. Stephens et al., Time course of production of cytokines and prostaglandin E2 by macrophages isolated after thermal injury and bacterial translocation. *Circ. Shock* 42: 154–162, 1994
- 66.. R.G. Molloy, M. O’Riordain, R. Holtzeimer, M. Nestor, K. Collins, J.A. Mannick et al., Mechanisms of increased tumor necrosis factor production after thermal injury. Altered sensitivity to PGE2 and immunomodulation by indomethacin. *J. Immunol.* 151: 2142–2149, 1993.
67. E.A. Durbin, M.S. Gregory, K.A. Messingham, C.V. Fontanilla, L.A. Duffner and E.J. Kovacs , The role of interleukin 6 in interferon- γ production in thermally injured mice. *Cytokine* 12:1669–1675, 2000
68. H. Nake, S. Endo, K. Inada, H. Yamashita, Y. Yamada, T. Taka et al., Plasma concentrations of type II phospholipase A₂, cytokines, eosinoids in patients with burns. *Burns* 21: 422–426, 1995
69. R.L. Gamelli, M. George, M. Sharp-Pucci, D.J. Dries and Z. Radisazljevic , Burn-induced nitric oxide release in humans. *J. Trauma* 39: 869–878, 1995
70. J. Prieser, P. Reper, D. Vlasselaer, B. Vray, H. Zang, G. Metz et al., Nitric oxide production is increased in patients after burn injury. *J. Trauma* 40: 368–371, 1996.
71. P.C. Calder, P. Yaqoob, F. Thies, F.A. Wallace and E.A. Miles Fatty acids and lymphocyte functions. *British Journal of Nutrition.* 87 (suppl): S31-S50, 2002
72. C. A. Dinarello, The Role of the Interleukin-1–Receptor Antagonist in Blocking Inflammation Mediated by Interleukin-1. *New Engl J Med* 343(10):732-734, 2000.
73. RK Chandra, Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr* 66: 460S-463S, 1997.
74. Fiona A. Wallace, Elizabeth A. Miles and Philip C. Calder, Activation state alters the effect of dietary fatty acids on pro-inflammatory mediator production by murine macrophages, *Cytokines* 12(9):1374-79, 2000.
75. Susanna Cunningham-Rundles, David F. McNeeley, Aeri Moon. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology response.* 115(6):1119-30, 2005
76. J W Alexander, H Saito, O Trocki, and C K Ogle. The importance of lipid type in the diet after burn injury. *Annals of Surgery.* 204(1):1-10, 1986

77. Curreri PW, Richemond D, Marvib J, Baxterr CR. Dietary requirements of patients with major burns. *J Am. Diet. Assoc.* 65 : 415-417, 1974
78. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, et al.. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4318–23, 1997
79. Calder PC. Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc Nutr Soc.* 61(3):345-58, 2002
80. Jean A. Nemzek, Hong-Yan Xiao, Anne E. Minard, Gerald L. Bolgos, Daniel Gé Remixk. Humane endpoints in shock research. *Shock* 21(1):17-25, 2004.
81. Viviane D. Bordé, Jacques Bernier and Dominique R. Garrel. Effects of dietary fatty acids on burn-induced immunosuppression. *Cellular Immunology.* 220(2):116-126, 2002
82. Leite, Milane S; Pacheco, Patricia ; Gomes, Rachel N; Guedes, Alexandre T; Castro-Faria-Neto, Hugo C; Bozza, Patricia T ; Koatz, Vera Lucia G. Mechanisms of increased survival after lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in mice consuming olive oil-enriched diet. *Shock* 23(2): 173-180, 2005
83. Khan AA, Slifer TR, Araujo FG, Suzuki Y, Remington JS., Protection against lipopolysaccharide-induced death by fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(11):3169-73, 2000.
84. S.T. O’Sullivan, T.P.F. O’Connor, Immunosuppression following thermal injury: the pathogenesis of immunodysfonction. *British Journal of Plastic Surgery.* 50: 615-623, 1997.
85. P Yaqoob, E A Newsholme, and P C Calder, The effect of dietary lipid manipulation on rat lymphocyte subsets and proliferation. *Immunology.* 1994 August; 82(4): 603–610.

VIII. ANNEXES

2018 Teklad Global 18% Protein Rodent Diet



Product Description—Teklad Global 18% Protein Rodent Diet is designed and manufactured with the same high quality ingredients in both the United States and throughout Europe. 2018 is a fixed formula, non-autoclavable diet containing 18% protein and 5% fat. Promotes gestation, lactation, and consistent growth of rodents. Absence of animal protein and fish meal eliminates the presence of nitrosamines. Does not contain alfalfa, thus lowering the occurrence of natural phytoestrogens. For autoclavable diet, please refer to 2018S Teklad Global 18% Protein Rodent Diet (Sterilizable). All Harlan Teklad Global Diets® are available certified.

Ingredients—Ground wheat, ground corn, wheat middlings, soybean meal, corn gluten meal, soybean oil, calcium carbonate, dried brewers yeast, dicalcium phosphate, iodized salt, L-lysine, DL-methionine, choline chloride, niacin, vitamin A acetate, biotin, pyridoxine hydrochloride, thiamine mononitrate, vitamin D₃ supplement, folic acid, menadione sodium bisulfite complex (source of vitamin K activity), vitamin E supplement, vitamin B₁₂ supplement, riboflavin, calcium pantothenate, ferrous sulfate, magnesium oxide, manganous oxide, zinc oxide, copper sulfate, calcium iodate, cobalt carbonate, chromium potassium sulfate.

Proximate Analysis

| | | |
|----------------------|----------------|-------------|
| Crude Protein | % | 18.90 |
| Crude Oil | % | 6.00 |
| Crude Fiber | % | 3.80 |
| Ash | % | 5.90 |
| NFE | % | 55.40 |
| Carbohydrate | % | 57.33 |
| Starch | % | 41.24 |
| Sugar | % | 4.93 |
| Digestible Energy | Kcal/g (MJ/kg) | 3.4 (14.03) |
| Metabolizable Energy | Kcal/g (MJ/kg) | 3.3 (13.70) |

Minerals

| | | |
|----------------|-------|--------|
| Calcium | % | 1.01 |
| Phosphorus | % | 0.65 |
| Sodium | % | 0.23 |
| Potassium | % | 0.68 |
| Chloride | % | 0.40 |
| Magnesium | % | 0.20 |
| Zinc | mg/kg | 77.00 |
| Manganese | mg/kg | 118.00 |
| Copper | mg/kg | 15.21 |
| Iodine (added) | mg/kg | 11.55 |
| Iron | mg/kg | 226.00 |
| Selenium | mg/kg | 0.20 |
| Cobalt | mg/kg | 0.63 |
| Chromium | mg/kg | 0.53 |

Amino Acids

| | | |
|------------------|---|------|
| Aspartic Acid | % | 1.42 |
| Glutamic Acid | % | 3.70 |
| Alanine | % | 1.08 |
| Glycine | % | 0.79 |
| Threonine | % | 0.67 |
| Proline | % | 1.55 |
| Serine | % | 0.97 |
| Leucine | % | 1.94 |
| Isoleucine | % | 0.85 |
| Valine | % | 0.95 |
| Phenylalanine | % | 0.99 |
| Tyrosine | % | 0.61 |
| Phe + Tyr | % | 1.60 |
| Methionine | % | 0.35 |
| Cystine | % | 0.33 |
| Met + Cyst | % | 0.69 |
| Lysine | % | 0.92 |
| Histidine | % | 0.47 |
| Arginine | % | 1.06 |
| Tryptophan | % | 0.20 |
| Available Lysine | % | 0.83 |

Vitamins

| | | |
|--|-------|---------|
| Vitamin A | iu/g | 15.40 |
| Retinol | mg/kg | 4.65 |
| Vitamin D ₃ | iu/g | 1.54 |
| Cholecalciferol | µg/kg | 38.39 |
| Vitamin E (α-tocopherol) | mg/kg | 101.00 |
| Vitamin K ₁ (menadione) | mg/kg | 51.00 |
| Vitamin B ₁ (thiamine) | mg/kg | 16.50 |
| Vitamin B ₂ (riboflavin) | mg/kg | 14.90 |
| Avail. Niacin (nicotinic acid) | mg/kg | 41.20 |
| Vitamin B ₆ (pyridoxine) | mg/kg | 18.50 |
| Pantothenic Acid | mg/kg | 33.00 |
| Vitamin B ₁₂ (cyanocobalamin) | mg/kg | 0.08 |
| Avail. Biotin | mg/kg | 0.30 |
| Folate | mg/kg | 3.34 |
| Vitamin C | mg/kg | 0.00 |
| Choline | mg/kg | 1120.00 |
| B Carotene | mg/kg | 2.47 |
| Inositol | mg/kg | 1455.00 |

Fatty Acids

| SATURATED | | |
|---------------------------------|------|-------|
| C4:0 Butyric | g/kg | 0.00 |
| C6:0 Caproic | g/kg | 0.00 |
| C8:0 Caprylic | g/kg | 0.00 |
| C10:0 Capric | g/kg | 0.00 |
| C12:0 Lauric | g/kg | 0.26 |
| C14:0 Myristic | g/kg | 0.06 |
| C15:0 Pentadecanoic | g/kg | 0.00 |
| C16:0 Palmitic | g/kg | 7.64 |
| C17:0 Margaric | g/kg | 0.00 |
| C18:0 Stearic | g/kg | 1.50 |
| C20:0 Arachidic | g/kg | 0.10 |
| C22:0 Behenic | g/kg | 0.03 |
| C24:0 Lignoceric | g/kg | 0.00 |
| MONO-UNSATURATED | | |
| C16:1 ω7 Palmitoleic | g/kg | 0.07 |
| C17:1 ω8 Heptadecenoic | g/kg | 0.00 |
| C18:1 ω9 Oleic | g/kg | 12.59 |
| C20:1 ω9 Gadoleic | g/kg | 0.17 |
| C22:1 ω9 Erucic | g/kg | 0.01 |
| POLYUNSATURATED | | |
| C18:2 ω6 Linoleic | g/kg | 31.35 |
| C18:3 ω3 Linolenic | g/kg | 2.76 |
| C18:4 ω3 Octadecatetraenoic | g/kg | 0.00 |
| C20:2 ω6 Eicosadienoic | g/kg | 0.00 |
| C20:3 ω6 Dihomo-gamma-linolenic | g/kg | 0.00 |
| C20:4 ω6 Arachidonic | g/kg | 0.00 |
| C20:5 ω3 Eicosapentanoic | g/kg | 0.00 |
| C22:5 ω3 Clupanodonic | g/kg | 0.00 |
| C22:6 ω3 Docosahexaenoic | g/kg | 0.00 |

Nutrient levels are calculated from raw material data and are adjusted to 10% moisture level in the diet. Reported nutrient values may vary due to the inherent variability in laboratory analysis.

Standard Product Form: Pellet

ANALYSIS*

NOTES**

1. CONSTITUENTS

Protein, %
 Fat, %
 Fibre, %
 on Free Extract (by difference), %

MINERALS

18.1 Calcium, % 0.97
 4.5 Phosphorus, % 0.85
 3.4 Potassium, % 0.67
 6.7 Magnesium, % 0.17
 57.3 Sodium, % 0.30
 Chloride, % 0.54
 Fluorine (max.), mg/kg 35.00
 14.1 Iron, mg/kg 170.00
 4.6 Zinc, mg/kg 70.00
 Manganese, mg/kg 87.00
 Copper, mg/kg 12.00
 Cobalt, mg/kg 0.34
 Iodine, mg/kg 0.50
 Selenium, mg/kg 0.20

2. CONSTITUENTS

1 Detergent Fibre (NDF), %
 2 Detergent Fibre (ADF), %
 Digestible Nutrients (TDN), %
 Energy (GE), kcal/g
 Physical Fuel Value*** (PFV), kcal/g

4.1
 3.4

3. ACIDS

Aspartic acid, %
 Glutamic acid, %
 Alanine, %
 Valine, %
 Isoleucine, %
 Leucine, %
 Phenylalanine, %
 Tyrosine, %
 Serine, %
 Threonine, %
 Proline, %
 Glycine, %
 Citric acid, %
 Succinic acid, %
 Malic acid, %
 Fumaric acid, %
 Tartaric acid, %
 Oxalic acid, %
 Lactic acid, %
 Acetic acid, %
 Formic acid, %
 Propionic acid, %
 Butyric acid, %
 Valeric acid, %
 Caproic acid, %
 Heptanoic acid, %
 Octanoic acid, %
 Nonanoic acid, %
 Decanoic acid, %
 Undecanoic acid, %
 Dodecanoic acid, %
 Tridecanoic acid, %
 Tetradecanoic acid, %
 Pentadecanoic acid, %
 Hexadecanoic acid, %
 Heptadecanoic acid, %
 Octadecanoic acid, %
 Stearic acid, %
 Arachidic acid, %
 Linoleic acid, %
 Linolenic acid, %
 Oleic acid, %
 Myristic acid, %
 Palmitic acid, %
 Stearic acid, %
 Arachidic acid, %
 Linoleic acid, %
 Linolenic acid, %
 Oleic acid, %
 Myristic acid, %
 Palmitic acid, %

4. VITAMINS

0.99 Menadione (added), mg/kg 8.8
 0.46 Thiamin, mg/kg 80.0
 0.83 Riboflavin, mg/kg 7.0
 0.40 Niacin, mg/kg 98.0
 0.70 Pantothenic Acid, mg/kg 30.0
 1.28 Choline, mg/g 1.6
 1.06 Folic Acid, mg/kg 8.0
 0.39 Pyridoxine, mg/kg 9.0
 0.82 Biotin, mcg/kg 350
 0.51 Vitamin B₁₂, mcg/kg 26
 0.63 Vitamin A, IU/g 41
 0.22 Vitamin D₃, IU/g 2.2
 0.83 Vitamin E, IU/kg 90

The chemical composition data is based upon ingredient analysis information. Nutrient composition may vary due to the natural variation in ingredient composition.

Nutrients have been calculated on a 90% dry matter basis.

$$PFV \text{ (kcal/g)} = ((\text{Protein, \%} \times 4) + (\text{Fat, \%} \times 9) + (\text{NFE, \%} \times 4)) \div 100$$

Agribrands Purina Canada
 404, Main St.,
 Woodstock, Ontario
 Canada
 N4S 1T6.

5075-U.S. CHARLES RIVER RODENT

5075-U.S. CHARLES RIVER RODENT

GUARANTEED ANALYSIS

| | |
|---------------------------|-------|
| Crude Protein, min. | 18.0% |
| Crude Fat, min. | 4.5% |
| Crude Fiber, max. | 5.5% |
| Ash, max. | 7.0% |
| Added minerals, max. | 2.5% |

INGREDIENTS

A list of the ingredients used in this feed may be obtained from the manufacturer.

FEEDING DIRECTIONS

Charles River Rodent should be fed at libitum to rodents. A plentiful quantity of clean, fresh water should be available to the animals at all times.

RATS: Adults rats will eat 12 to 15 grams of diets per day. Feeders in rat cages should be designed to hold two to three days' supply of feed at one time.

MICE: Adult mice will eat 4 to 5 grams of pelleted ration daily. Some of larger strains may eat as much as 8 grams per animal per day. Feed should be available on free-choice basis in wire feeders above the floor of the cage.

HAMSTER: Adults will eat 10-14 grams per day.

CAUTION

Feed is perishable. Store in a dry, well ventilated area protected from rodents and insects.

Disclaimer of Liability:

Individual results from use of this product may vary based upon differences in customers' programs of management, health, sanitation, breeding, genetics and feeding. Therefore, Agribands Canada and its Dealers do not warrant or guarantee individual results.

C121998

