

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Support nutritionnel et grands brûlés:
Étude sur l'importance de la glutamine
au niveau des fonctions immunitaires**

Par
Julie Champoux
Baccalauréat en biologie (B.Sc.)

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Examineur externe	Manon Choinière, Centre des grands brûlés, Hôtel-Dieu de Montréal CHUM
Examineur interne	Michel Fournier
Directeur de recherche	Jacques Bernier
Codirecteur de recherche	Dominique Garrel, Centre des grands brûlés, Hôtel-Dieu de Montréal CHUM, Pavillon Masson

Résumé

Malgré le progrès dans la prévention, les brûlures graves continuent de représenter une menace majeure pour la santé et le bien-être des gens à travers le monde entier et ce, dans tous les groupes d'âge. En dépit des interventions chirurgicales et des thérapies antibiotiques agressives, les complications dues à des infections sont une cause majeure de mortalité chez les grands brûlés, comptant pour approximativement 75% de tous les décès survenant après l'administration des premiers soins. La brûlure est caractérisée par des désordres métaboliques et hormonaux importants, par une réponse inflammatoire systémique et une immunosuppression qui augmente la susceptibilité aux infections, non pas seulement par les pathogènes communs, mais aussi par des organismes qui ne sont normalement pas dangereux pour des hôtes en bonne santé.

Dans les dernières décennies, il a été démontré qu'un support nutritionnel adéquat pouvait grandement améliorer la condition des patients brûlés. L'effet de différentes proportions et types de lipides dans la diète a été étudié. Les suppléments de certains acides aminés considérés favorables pour le système immunitaire, dont la glutamine, ont aussi fait l'objet d'études. La glutamine est l'acide aminé le plus abondant dans le plasma des mammifères et elle est transportée et métabolisée activement dans presque tous les tissus. La glutamine joue plusieurs rôles importants au niveau métabolique, mais en plus, elle est une source d'énergie impliquée dans les phénomènes entourant la réponse immunitaire.

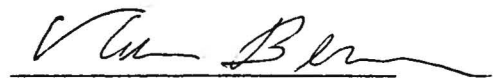
Les effets d'une diète enrichie en glutamine, administrée par voie entérale, chez des grands brûlés ont donc fait l'objet de ce mémoire. Les résultats attendus étaient une augmentation de l'activité phagocytaire des neutrophiles et une amélioration dans les sous-populations de leucocytes. Ces améliorations auraient donc engendré une diminution de la durée des soins, du taux de mortalité et de morbidité. Cette étude a été réalisée en double aveugle avec une cohorte de 38 patients. Des prélèvements sanguins ont été effectués aux jours 4, 7, 14, 21 et 28 du protocole. À partir des leucocytes

sanguins, des tests fonctionnels ont été effectués pour évaluer certains paramètres de la réponse immunitaire, comme la phagocytose, la flambée oxydative, le potentiel mitochondrial et les thiols. Les populations de leucocytes, par l'expression de récepteurs membranaires spécifiques, ont été étudiés. Tous les tests ont été réalisés par cytométrie de flux. Les résultats obtenus au jour 28 du protocole ont été exclus pour effectuer les analyses statistiques à cause de trop de données manquantes. Les résultats ont démontré des effets positifs de la glutamine, majoritairement au niveau de l'augmentation de sous-populations de cellules T qui jouent des rôles majeurs dans la réponse immunitaire spécifique. L'intensité de la phagocytose des granulocytes et des monocytes a été significativement plus basse au niveau du groupe recevant la glutamine. Il y a également deux populations de cellules exprimant les récepteurs membranaires, le CD16b ($P = 0.05$) et le CD11b ($P = 0.05$), qui se sont retrouvées en plus bas nombre dans le groupe recevant la glutamine. Par contre, le nombre de cellules exprimant soit le CD19, le CD3, le CD4 ou le CD8, parmi la sous-population de lymphocytes, s'est retrouvé significativement plus élevé chez les patients recevant la glutamine.

Donc, contrairement aux idées véhiculées, la glutamine ne semble pas augmenter les fonctions des phagocytes ou diminuer la durée des soins. Une chose certaine, c'est que la glutamine rétablit partiellement plusieurs sous-population de lymphocytes. Elle diminue aussi le taux de mortalité et le taux d'infections sanguines par un facteur de trois. Les hypothèses sont que la glutamine contribuerait à diminuer le stres oxydatif et l'apoptose des lymphocyte, améliorant ainsi la collaboration entre les sous-population de lymphocytes et par le fait même l'efficacité de la réponse immunitaire spécifique.



Julie Champoux
Étudiante



Jacques Bernier
Directeur de recherche

Remerciements

En premier lieu, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Jacques Bernier. Il m'a permis de m'enrichir et d'acquérir une bonne formation dans le domaine de l'immunologie. Je tiens aussi à souligner le soutien d'une personne très spéciale, Claudine Hamelin, celle qui m'a tout appris du laboratoire et qui m'a permis d'apprécier toutes les heures passées dans la salle de culture!

Je remercie également tous les étudiants qui ont travaillé avec moi dans le laboratoire: Philippe, Myrian, Julie, Michèle et Jill pour leurs conseils et leur agréable présence.

Je voudrais aussi remercier le personnel à l'Hôtel-Dieu qui a permis la réalisation de ce projet, les médecins, les infirmières et le personnel en collaboration directe avec nous: Anna De Oliviera, Nathalie Jobin, Manon Choinière et le Docteur Dominique Garrel.

Finalement, je voudrais dire merci à l'INRS Institut Armand-Frappier pour le soutien financier que j'ai reçu, il m'a permis de me consacrer entièrement à mes études tout au long de ma maîtrise. Puis, un merci à tous les gens du Campus Pointe-Claire, le personnel et les étudiants: j'ai passé deux années merveilleuses qui resteront gravées dans ma mémoire...

Table des matières

Résumé.....	i
Remerciements.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures	viii
Liste des Tableaux	x
Liste des abréviations.....	xi
Chapitre 1	1
Introduction.....	1
Chapitre 2.....	6
Revue de littérature et projet d'étude	6
2.1 La brûlure.....	6
2.1.1 Le métabolisme et la brûlure.....	7
2.1.1.1 Anormalités métaboliques dans l'utilisation du glucose	9
2.1.1.2 Anormalités métaboliques dans l'utilisation des lipides.....	10
2.1.1.3 Anormalités métaboliques dans l'utilisation des protéines et acides aminés	10
2.1.1.4 Anormalité des micronutriments.....	12
2.1.1.5 Modulation des désordres métaboliques.....	13
2.2 Réponse immunitaire	15
2.3 La réponse inflammatoire	19
2.4 La translocation bactérienne	21
2.5 La réponse immunitaire et la brûlure	22
2.5.1 Effets sur la réponse non-spécifique.....	22
2.5.2 Effets sur la réponse spécifique	24
2.5.2.1 Atteinte à la réponse humorale.....	25
2.5.2.3 Effets sur la différenciation des lymphocytes T, Th1 ou Th2 ?.....	27
2.5.2.4 Anergie des lymphocytes T	28
2.6 Importance du support nutritionnel.....	29

2.6.1 Études de l'importance des lipides	30
2.6.2 Importance de la glutamine.....	32
2.6.2.1 Importance métabolique de la glutamine	33
2.6.2.2 Rôle du transport de l'azote.....	33
2.6.2.3 Contrôle de l'oxydoréduction cellulaire	34
2.6.2.4 Intermédiaire métabolique	34
2.6.2.5 La glutamine, source d'énergie	35
2.6.2.6 Importance au niveau du tractus gastrointestinal.....	35
2.6.2.7 Implication au niveau du système immunitaire	36
2.6.2.8 Expériences et essais cliniques sur la glutamine.....	37
2.7 Projet d'étude.....	39
Chapitre 3.....	40
Matériel et méthodes.....	40
3.1 Patients et soins des patients	40
3.1.1 Support nutritionnel	41
3.1.2 Suppléments de glutamine	42
3.2 Préparation des cellules sanguines.....	42
3.3 Technique de cytométrie en flux.....	43
3.4 Phagocytose	44
3.5 Flambée oxydative	45
3.6 Potentiel mitochondrial	46
3.7 Thiols	47
3.8 Phénotypage.....	48
3.9 Analyse de données.....	49
3.10 Analyses statistiques	49
Chapitre 4.....	51
Résultats.....	51
4.1 Patients inclus dans l'étude.....	51
4.2 Fonctions des phagocytes.....	52
4.2.1 Fonctions des neutrophiles.....	52
4.2.1.1 Phagocytose	52

4.2.1.2	Flambée oxydative	53
4.2.1.3	Potentiel mitochondrial	53
4.2.1.4	Thiols	53
4.2.2	Fonctions des macrophages	54
4.2.2.1	Phagocytose	54
4.2.2.2	Flambée oxydative	54
4.2.2.3	Potentiel mitochondrial	54
4.2.2.4	Thiols	55
4.3	Analyse des populations de leucocytes	61
4.3.1	Les neutrophiles/CD16b	61
4.3.2	Les macrophages/CD14	61
4.3.3	Les lymphocytes	62
4.3.3.1	Potentiel mitochondrial	62
4.3.3.2	Thiols	62
4.3.3.3	Les lymphocytes B/CD19	62
4.3.3.4	Les lymphocytes T/CD3	63
4.3.3.5	Les sous-populations de lymphocytes/CD4 et CD8	64
4.3.4	Expression des marqueurs d'activation	65
4.3.4.1	Expression du CD11b	65
4.3.4.2	Expression des antigènes de classe II du CMH/HLA-DR	65
Chapitre 5	76
Discussion	76
5.1	Fonctions des phagocytes.....	77
5.1.1	Phagocytose	77
5.1.2	Flambée oxydative	79
5.1.3	Potentiel mitochondrial	80
5.1.4	Thiols - Glutathion.....	81
5.2	Analyse des populations de leucocytes.....	82
5.2.1	Les neutrophiles/CD16b	83
5.2.2	Les macrophages/CD14	83
5.2.3	Les lymphocytes	84

5.2.3.1 Les lymphocyte B/CD19.....	84
5.2.3.2 Les lymphocytes T/CD3	85
5.2.3.3 Les sous-populations de lymphocytes/CD4 et CD8	86
5.2.4 Expression des marqueurs d'activation	87
5.2.4.1 Expression du CD11b	87
5.2.4.2 Expression des antigènes de classe II du CMH/HLA-DR.....	88
5.3 Analyse des points forts et des limites de l'étude.....	89
5.4 Analyse globale des effets de la glutamine.....	90
Chapitre 6.....	91
Conclusion	91
Liste de références	93

Liste des figures

Figure 1: Discrimination de différentes populations cellulaires selon la dispersion de la lumière.....	44
Figure 2: Résultats de phagocytose obtenus avec les leucocytes du sang des patients brûlés (■ Patients a.a., □ Patients gln), aux différents jours du protocole.....	55
Figure 3: Intensité de la phagocytose qui a été effectuée par des populations de cellules provenant du sang des patients brûlés (■ Patients a.a., □ Patients gln) aux différents jours du protocole.	56
Figure 4: Comparaison de l'intensité de la flambée oxydative entre les deux groupes de patients brûlés (■ Patients a.a., □ Patients gln).....	57
Figure 5: Évaluation du potentiel mitochondrial des différentes populations de leucocytes (A) Granulocytes, (B) Monocytes, (C) Lymphocytes, parmi les deux groupes de patients brûlés (■ Patients a.a., □ Patients gln).....	58
Figure 6: Dosage des molécules de petit poids moléculaire contenant des thiols chez les différentes populations de leucocytes (A) Granulocytes, (B) Monocytes, (C) Lymphocytes, parmi les deux groupes de patients brûlés (■ Patients a.a., □ Patients gln).....	59
Figure 7: Quantité de cellules exprimant le CD16b parmi la population totale des leucocytes des patients brûlés (■ Patients a.a., □ Patients gln).....	66
Figure 8: Quantité de cellules exprimant le CD14 parmi la population totale de leucocytes des patients brûlés (■ Patients a.a., □ Patients gln).....	67
Figure 9: Quantité de cellules exprimant le CD19 parmi la population de lymphocytes des patients brûlés (■ Patients a.a., □ Patients gln).....	68
Figure 10: Quantité de cellules exprimant le CD3 (A) parmi la population totale des leucocytes, (B) parmi la population de lymphocytes des deux groupes de patients brûlés (■ Patients a.a., □ Patients gln).....	69
Figure 11: Quantité de cellules exprimant simultanément le CD3 et CD4 parmi la population de lymphocytes des groupes de patients brûlés (■ Patients a.a., □ Patients gln).....	70

- Figure 12:** Quantité de cellules exprimant simultanément le CD3 et CD8 parmi la population de lymphocytes des groupes de patients brûlés (■ Patients a.a., ▣ Patients gln).....71
- Figure 13:** Quantité de cellules exprimant le CD11b parmi la population totale des leucocytes du sang périphérique des patients brûlés (■ Patients a.a., ▣ Patients gln.).....72
- Figure 14:** Quantité de cellules exprimant (A) le HLA-DR parmi la population totale des leucocytes (B) simultanément le CD3 et HLA-DR parmi la population de lymphocytes des groupes de patients brûlés (■ Patients a.a., ▣ Patients gln).....73

Liste des Tableaux

Tableau I: Anormalités métaboliques majeures en réponse à la brûlure.....	8
Tableau II: Fonctions clé de la glutamine.....	12
Tableau III: Déficiences en micronutriments après la brûlure.....	13
Tableau IV: Composition de la formule entérale (quantité/L).....	41
Tableau V: Nombre de décès et d'extubations parmi les patients inclus dans l'étude.....	49
Tableau VI: Caractéristiques des patients inclus dans l'étude.....	49
Tableau VII: Résumé des différences significatives observées entre les deux groupes de patients brûlés, parmi les résultats obtenus au cours de l'étude.....	74

Liste des abréviations

a.a.	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
APC	<i>Antigen presenting cell</i> = cellule présentatrice d'antigène
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> = albumine de sérum bovin
CARS	<i>Compensatory anti-inflammatory response syndrome</i> = syndrome de la réponse compensatoire anti-inflammatoire
CMFDA	chlorométhylfluorescéine
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CSF	<i>Colony stimulating factor</i> = facteur stimulant les colonies
ctrl	Contrôle
DCFDA	Dichlorodihydrofluorescéine
EDTA	Acide tétra-acétique d'éthylènediamine
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i> = cytomètre en flux
FITC	Fluorescéine
FSC	<i>Forward scattered</i>
gln	Glutamine
GSH	Glutathion (oxydé)
GSSG	Glutathion (réduit)
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i> = solution saline équilibrée de Hanks
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> = antigène des leucocytes humains
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i> = molécule d'adhésion intercellulaire
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IL-2R	Récepteur de l'interleukine-2
INF	Interféron
LPS	Lipopolysaccharides

MAC	<i>membrane attack complex</i> = complexe d'attaque de la membrane
MBL	<i>Mannan-binding lectin</i> = lectines liant les mannanes
MODS	<i>multiple organe dysfunction syndrome</i> = syndrome de dysfonction polyviscérale
NAD	Nicotineamide adénine dinucléotide
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> = solution saline tamponnée de phosphate
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PE	Phycoérythrine
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PMN	Polymorphonucléaires
SRIS	Syndrome de la réponse inflammatoire systémique
SSC	<i>Side scattered</i>
TBSA	<i>Total body surface area</i> = Aire totale de la surface du corps
TCR	<i>T cell receptor</i> = récepteur des cellules T
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> = facteur de nécrose tumorale

Chapitre 1

Introduction

Les brûlures sévères sont une cause majeure de mortalité et de morbidité à travers le monde. Elles amènent des perturbations d'ordre métabolique, hormonale, immunologique et circulatoire très importantes (Wolfe, 1996).

Une des caractéristiques que l'on retrouve chez tous les grands brûlés est le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS). Le terme de SRIS a été adopté en 1991 par la Société de Médecine des Soins Intensifs (*Society of Critical Care Medicine*), il s'applique à un processus inflammatoire généralisé, indépendamment de la cause, et est caractérisé par la présence de deux critères parmi les suivants :

- Température corporelle $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$;
- Tachycardie de > 90 bpm ;
- Tachypnée $> 20/\text{min}$ ou $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg ;
- Leucocytose $> 12\,000/\mu\text{l}$, ou leucopénie $< 4000/\mu\text{l}$, ou $> 10\%$ de formes immatures. (O'Sullivan et O'Connor, 1997).

Le SRIS constitue la réponse primaire de l'hôte à une variété de situations cliniques comme par exemple, un traumatisme, une brûlure, une pancréatite ou une intervention chirurgicale majeure. À la base, l'inflammation est supposée être un phénomène local. Plusieurs facteurs bactériens ou non-bactériens peuvent causer de l'inflammation locale. Cependant, quand cette inflammation prend des proportions plus importantes, elle devient difficile à circonscrire. S'il y a un débordement de médiateurs de l'inflammation dans la circulation sanguine, alors ceci provoque une inflammation systémique (Goris, 1996). Cette réponse inflammatoire exagérée déclenche une surproduction de cytokines inflammatoires telles que l'interleukine- 1β (IL- 1β), le facteur de nécrose tumorale α (*tumor necrosis factor* α = TNF α), l'interleukine-6 (IL-6) et une trop grande stimulation des cellules immunitaires. Ces mécanismes sont potentiellement responsables de l'état d'immunosuppression des patients (Weiss *et al.*, 1999). Le SRIS peut aussi mener à une

septicémie ou provoquer d'autres dommages tissulaires importants (O'Sullivan et O'Connor, 1997).

Le phénomène d'immunosuppression chez les grands brûlés constitue un problème majeur car il contribue à augmenter la susceptibilité des patients aux infections diverses. Le degré d'immunosuppression augmente avec la sévérité de la brûlure, c'est-à-dire avec l'aire totale de la surface du corps brûlé (*Total Body Surface Area* = TBSA) et la profondeur de celle-ci. On considère un patient comme un grand brûlé lorsque TBSA de la brûlure dépasse 20%. Plus il y a présence de brûlures au troisième degré, pires seront les modifications physiologiques (Griswold, 1993).

La réponse immunitaire de l'hôte met en jeu des mécanismes complexes impliquant plusieurs types de cellules ainsi que des médiateurs chimiques et hormonaux responsables de la régulation de la défense de l'organisme (O'Sullivan et O'Connor, 1997). La brûlure engendre des dérèglements autant au niveau de la réponse immunitaire spécifique que la réponse spécifique cellulaire et humorale (Griswold, 1993). Au niveau de la réponse cellulaire, une répression excessive de l'activité cytotoxique des lymphocytes T a été observée chez des patients brûlés (Heideman et Bengtsson, 1992). D'autres ont étudié des effets au niveau de la réponse non-spécifique telle que les fonctions primaires des neutrophiles (détection, opsonisation, ingestion et destruction de bactéries, productions de superoxydes) qui dépendent d'une activité efficace d'explosion oxydative pour se rendre compte que celles-ci sont altérées. Les activités bactéricides des macrophages sont aussi affaiblies (Yang et Hsu, 1992). Ce sujet sera abordé, plus en profondeur, dans le prochain chapitre.

Une brûlure sévère est aussi caractérisée par une phase d'hypermétabolisme, c'est-à-dire une augmentation du taux métabolique, une balance azotée négative, une perte de poids et de masse maigre, des anomalies au niveau du métabolisme des lipides, des glucides et des minéraux. Cet état d'hypermétabolisme est proportionnel à la sévérité de la brûlure et augmente avec l'étendue de celle-ci (Le Boucher et Cynober, 1997). Les hormones cataboliques telles que les catécholamines, les glucocorticoïdes et le glucagon jouent un rôle important dans le développement de l'hypermétabolisme alors que leurs

concentrations plasmatiques sont 2-4 fois au-dessus des taux normaux, avec une observation des concentrations les plus élevées durant la première semaine après la brûlure (Le Boucher et Cynober, 1997). Après avoir découvert que les grands brûlés avaient des besoins accrus en nutriments et qu'il présentaient des problèmes similaires à certains cas de malnutrition, les médecins et chercheurs ont commencé à attribuer beaucoup d'importance à la diète que recevaient les patients brûlés.

Dans les années 1970, après avoir introduit un nouveau mode d'alimentation plus agressif, à l'aide d'un tube directement inséré par la bouche pour se rendre à l'estomac (par voie entérale), on a observé de nettes améliorations chez les patients brûlés concernant le taux de mortalité. Par contre, les patients traités continuaient à éprouver une variété de problèmes d'ordre immunologique qui étaient très semblables à ceux observés chez des humains ou chez des modèles expérimentaux animaux qui souffraient de malnutrition (Alexander et Gottschlich, 1990).

Parmi les premières interventions nutritionnelles concernant la quantité de lipides que l'on devait administrer dans la diète, l'augmentation du pourcentage de lipides a été considérée. L'objectif visé était de répondre à l'hypermétabolisme retrouvé chez les patients brûlés. Certains chercheurs ont fait la promotion des lipides comme source de calories parce que la densité plus élevée en calories des lipides répondait à la demande d'état hypermétabolique des patients brûlés et parce que ceux-ci semblaient démontrer une métabolisation normale et même accélérée des lipides (Carpentier *et al.*, 1979). Les opposants aux diètes élevées en lipides, tout en étant d'accord avec le principe énoncé ci-haut, craignaient que des taux élevés de lipides puisse être nuisibles à cause d'un effet défavorable sur la réponse immunitaire, provoquant ainsi une augmentation de la susceptibilité aux infections (Locniskar *et al.*, 1983). En utilisant un modèle de nutrition hautement standardisé sur des cochons d'Inde brûlés, Mochizuki et Alexander ont réussi à démontrer qu'une diète avec une concentration normale en lipides (30 ou 50% de calories, utilisant de l'huile de tournesol comme source de lipides) entraîne des effets délétères au niveau de la masse musculaire, de la balance azotée et des protéines contenues dans le sérum incluant le C3 (molécule centrale du système du complément jouant le rôle

d'opsonine) et la transferrine (Alexander et al., 1986 ; Mochizuki *et al.*, 1984). Puisque certains types de lipides sont des précurseurs de l'acide linoléique menant à la voie de l'acide arachidonique, cela suggère que la suractivation de cette voie, en donnant une trop grande quantité de précurseurs d'acide linoléique, soit responsable des effets dommageables des lipides dans la diète (Alexander *et al.*, 1986). En administrant une diète faible en lipide chez les patients brûlés, les effets indésirables diminuent donc par le fait même. Une étude clinique à été menée chez des patients brûlés pour déterminer les effets d'une diète faible en lipides (15% lipides) et celle-ci s'est avérée positive. Les effets constatés ont été un taux d'incidence plus bas de pneumonies, des fonctions respiratoires améliorées, un rétablissement plus rapide du statut nutritionnel, un meilleur profil métabolique et une durée des soins plus courte d'environ 21 jours (Garrel, *et al.*, 1995).

Suite à plusieurs études sur les lipides, les chercheurs ont commencé à s'intéresser à d'autres composantes de la diète pour essayer d'améliorer la condition des patients brûlés. Leurs intérêts ont grandi envers certaines molécules d'acides aminés, comme la glutamine qui est maintenant reconnue comme étant un "carburant" essentiel du système immunitaire. La glutamine est l'acide aminé le plus abondant dans le plasma et les muscles; c'est un substrat intégral pour un nombre important de fonctions métaboliques (Gore et Jahoor, 2000). Parce que la glutamine peut être synthétisée *de novo*, elle a historiquement été désignée comme un acide aminé non-essentiel. La glutamine est impliquée dans la synthèse des acides nucléiques, elle est donc nécessaire à la division des cellules. Tout processus nécessitant une division rapide de cellules engendrera donc un besoin accru de glutamine. Ces phénomènes sont souvent observés lors d'une réponse immunitaire où certains types de cellules, comme des lymphocytes par exemple, reçoivent un signal pour entrer en division rapide (Labow et Souba, 2000). Des études faites par Labow et Souba (2000) sur la culture de tissus ont démontré que lorsque les milieux de culture n'étaient pas supplémentés avec de la glutamine, la capacité des lymphocytes à répondre à une stimulation mitogénique était sévèrement limitée.

La glutamine joue un rôle important dans de multiples fonctions comme le transport de l'azote, la fabrication de protéines et de nucléotides, le maintien de l'intégrité de la muqueuse intestinale, le maintien de l'état d'oxydoréduction des cellules, comme source d'énergie, etc. Cette molécule est abondante dans le sang, mais elle est consommée rapidement et possède un taux de renouvellement extrêmement rapide (Labow et Souba, 2000). C'est pour cette raison que dans des situations de stress, elle devient un acide aminé, "conditionnellement essentiel", et que plusieurs équipes de recherche ont décidé d'étudier les bienfaits de l'administration de glutamine lors de situations particulières.

Le but de ce projet était d'investiguer les effets de l'administration de glutamine par voie entérale chez les grands brûlés. Il s'agit de la première fois qu'une telle étude est menée avec une si grande cohorte de patients sévèrement brûlés. Dans le cadre de cette étude, des tests fonctionnels ont été effectués pour évaluer certaines fonctions immunitaires. La durée des soins, le nombre d'infections, de complications et le taux de mortalité ont aussi été évalués. L'hypothèse de travail émise était que la glutamine diminuerait l'occurrence des infections et des complications, la durée des soins et la morbidité de même qu'elle améliorerait les fonctions immunitaires, particulièrement par une action sur les cellules phagocytaires.

Chapitre 2

Revue de littérature et projet d'étude

Dans ce chapitre, une revue sera effectuée sur les connaissances actuelles des effets qu'engendrent des brûlures sévères aux niveaux du métabolisme, de la réponse immunitaire et de la réponse inflammatoire. Ensuite suivra l'importance du support nutritionnel que reçoivent les patients brûlés et les effets d'un supplément de glutamine dans la diète.

2.1 La brûlure

Une brûlure majeure est l'un des types de blessures des plus dévastatrices expérimentées par l'homme. Elle est souvent létale, produit un maximum de réponses physiologiques, et laisse des cicatrices physiques et émotionnelles durables.

La brûlure proprement dite est une lésion cutanée provoquée par un agent causal (thermique, électrique, physique, chimique) dont la gravité dépend du temps d'exposition à celui-ci. La gravité de la brûlure est déterminée par son étendue et surtout sa profondeur. Certains codes cliniques ont été établis pour déterminer le type de brûlure. Une brûlure du premier degré constitue une atteinte de l'épiderme superficiel. Elle se caractérise par de la rougeur, chaleur, douleur et absence de cloques. Une destruction totale de l'épiderme se définit par une brûlure du 2^{ième} degré superficiel, et elle se caractérise par une couleur rouge, une grande sensibilité et la présence de cloques. Le 2^{ième} degré profond représente la destruction de l'épiderme basal et une partie du derme. À ce stade, la couleur des tissus est blanche ou rosée, il y a une baisse de la sensibilité et présence de cloques. Une destruction totale de la peau et des tissus sous-cutanés est une brûlure du 3^{ième} degré. Ce genre de brûlure est reconnue par plusieurs caractéristiques: les tissus sont blancs, noirs ou même marron (plus c'est profond, plus c'est foncé), une absence totale de sensibilité, une peau cartonnée et une nécrose adhérente qui est source

d'infection. Pour ce qui est de déterminer l'étendue totale de la brûlure, chaque centre possède une méthode bien précise. Il existe, entre autres, la table de Lund et Browder et la règle des neufs de Wallas pour déterminer cette étendue de brûlure (Miller *et al.*, 1991). Chaque partie du corps équivaut à un certain pourcentage. Au Centre des Grands Brûlés de l'Hôtel-Dieu de Montréal, pour être reconnu comme un grand brûlé, il faut avoir subi des brûlures du 2^{ième} ou 3^{ième} degré à plus de 20% de la surface totale du corps (TBSA).

Les brûlures majeures requièrent des traitements multidisciplinaires pour la survie et le rétablissement des patients. Dans les dernières années, les progrès au niveau des traitements ont réduit le taux de mortalité et ont augmenté la qualité de vie des survivants. Les brûlures sont associées à des altérations anatomiques, physiologiques, endocrinologiques et immunologiques. Une blessure cutanée résulte en une perte significative de fluides et le relâchement de médiateurs inflammatoires multiples. Quand des bactéries et des médiateurs inflammatoires sont disséminées par la circulation à des organes centraux, ils peuvent causer des problèmes cardiovasculaires, une rupture de l'intégrité de la muqueuse gastrointestinale, une immunosuppression et finalement, des défaillances multiples aux organes. Une atteinte au système respiratoire par inhalation peut accélérer davantage ces réponses (Nguyen *et al.*, 1996).

2.1.1 Le métabolisme et la brûlure

Des brûlures sévères engendrent des dérèglements métaboliques profonds, en combinaison avec le relâchement de médiateurs de l'inflammation et le développement d'un environnement hormonal anormal induit par le stress.

La combinaison de l'augmentation des hormones endogènes cataboliques, comme le cortisol et les catécholamines, et la baisse de l'activité endogène normale des agents anaboliques (hormone de croissance et testostérone) résultent en une importante perte nette de protéines (Jeevanandam *et al.*, 1992 ; Plymate *et al.*, 1987). Le degré d'augmentation de la demande métabolique varie selon l'étendue de la brûlure et la profondeur (Smith *et al.*, 1997). Des blessures causées par l'inhalation de fumée

accentuent l'augmentation du taux métabolique. Même si le pic d'hypermétabolisme n'apparaît pas évident pour plusieurs jours, il est maintenant clair que l'état d'hypermétabolisme existe immédiatement après la brûlure, mais qu'il ne se manifeste cliniquement que lorsqu'il y a une augmentation d'apport d'oxygène et de nutriments aux tissus, permettant la manifestation de l'augmentation de l'activité métabolique (Demling et Seigne, 2000).

Tableau I. Anormalités métaboliques majeures en réponse à la brûlure

➤	Augmentation des hormones cataboliques (cortisol et catécholamines)
➤	Diminution des hormones anaboliques (hormone de croissance et testostérone)
➤	Augmentation marquée du taux métabolique
➤	Augmentation soutenue de la température corporelle
➤	Augmentation importante de la demande en glucose et de la gluconéogenèse du foie
➤	Atrophie des muscles squelettiques avec les acides aminés utilisés comme source d'énergie (contrairement à la canalisation normale des nutriments)
➤	Manque de corps cétoniques, indiquant que les lipides ne sont pas la source majeure de calories
➤	Manque de réponse du catabolisme à la prise de nutriments

(Demling et Seigne, 2000)

L'augmentation locale de l'activité métabolique et le travail cellulaire est requis au site de la brûlure. Les tissus dévitalisés et endommagés doivent être réabsorbés par l'hôte et ensuite, les tissus doivent être réparés. Les plaies causées par la brûlure consomment une grande quantité d'énergie durant le processus de guérison effectué par de grandes populations de cellules inflammatoires et des fibroblastes produisant de la matrice cellulaire et du collagène (Smith *et al.*, 1997 ; Kinney *et al.*, 1970).

La masse maigre du corps constitue jusqu'à 70% du poids corporel, avec 75% d'eau et 25% de protéines. La masse de protéines n'est pas un dépôt d'accumulation comme le gras. Chacune des molécules a un rôle fonctionnel dans l'homéostasie. Il n'y a pas de protéines en surplus. La masse adipeuse, par contre, n'a pas de rôle, à l'exception d'une accumulation de calories, faisant environ 25% de la masse corporelle (Demling et Seigne, 2000). Le degré de perte de masse maigre dans un état catabolique est en

corrélation avec la morbidité (ensemble des causes qui peuvent produire une maladie) et la mortalité. Une perte de masse maigre excédant 15% du total résulte en une baisse de la guérison des plaies. Avec 30% de perte de masse maigre, il y a une augmentation marquée des infections, une faiblesse sévère, des problèmes cutanés (plaies de lit) et une absence de guérison des plaies. Une perte de plus de 40% de masse maigre est habituellement fatale (Pollack, 1979).

La perte de calories et l'augmentation des dépenses d'énergie forcent l'organisme à utiliser les hydrates de carbone, les réserves de lipides et de protéines, ainsi le métabolisme est affecté de différentes façons selon l'évolution du trauma : la phase aiguë, la phase de récupération et la phase de convalescence (Le Boucher et Cynober, 1997). Une agression thermique importante induit une réponse métabolique caractérisée par une augmentation du taux métabolique, mais aussi par une perte azotée, une perte de poids et de masse maigre et des anomalies dans le métabolisme des lipides, des protéines, des hydrates de carbone et minéraux. L'hypermétabolisme est associé avec une redistribution de l'utilisation des nutriments en faveur des organes viscéraux. Les protéines des muscles servent à cette fin; ainsi le métabolisme des protéines est profondément altéré (Le Boucher et Cynober, 1997).

2.1.1.1 Anormalités métaboliques dans l'utilisation du glucose

La production de glucose, ou gluconéogenèse, est très élevée après la brûlure (Wolfe, 1996). L'augmentation de la production est excessive pour l'utilisation qu'en font les tissus et cela mène à un "stress diabétique". La cause de ce processus incontrôlé est due à une augmentation de la production, une perte de l'action suppressive normale du glucose exogène sur la production endogène et une diminution de l'efficacité de l'insuline ou de l'absorption du glucose périphérique. Ces phénomènes résultent en une hyperglycémie, une augmentation de dépôt de gras, une augmentation du catabolisme et une perte d'énergie. Malgré le fait que le glucose demeure un substrat favorable à l'énergie des tissus, il y a une limite bien définie à son utilisation à cause de la résistance à l'insuline après la brûlure (Demling et Seigne, 2000). La source de glucose produit est

augmentée de deux fois. Premièrement, le lactate est converti en glucose dans le foie par une augmentation de l'activité du cycle de Cori. Le site primaire de l'augmentation de la production du lactate est la plaie causée par la brûlure et le processus généralisé de l'inflammation systémique.

La deuxième source de lactate provient de la désamination de l'acide aminé alanine. L'alanine est relarguée du muscle, grâce à un stimulus catabolique, et transportée au foie pour l'enlèvement de ses molécules d'azote et sa conversion en glucose (Wolfe, 1996). La production du glucose n'est cependant pas la solution la plus efficace de la réponse catabolique. Les processus métaboliques et cataboliques sont reliés, mais dirigés par des mécanismes différents, donc, même s'il y a une résistance à l'insuline, l'absorption du glucose cellulaire est augmentée et le glucose utilisé comme source d'énergie (Wolfe, 1996).

2.1.1.2 Anormalités métaboliques dans l'utilisation des lipides

Comme les autres formes de stress, la brûlure entraîne une augmentation de la lipolyse; principalement via les catéchols, et particulièrement via la stimulation des récepteurs β_2 adrénergiques (Herndon *et al.*, 1994). Cependant, le taux d'augmentation de la production d'acides gras libres n'est pas relié à leur oxydation pour du carburant, au moins 70% sont recyclés. Ainsi, au plus, 30% des acides gras libres sont utilisés comme carburant, ou source d'énergie, en comparaison avec un état de famine où près de 90% des acides gras libres sont oxydés. Par conséquent, la quantité de gras exogène qui peut être utilisée comme source d'énergie après la brûlure est limitée. La majorité des acides gras du plasma sont soumis à une réestérification dans le foie (ce qui les retransforme en gras), procédé qui demande de l'énergie (Herndon *et al.*, 1994).

2.1.1.3 Anormalités métaboliques dans l'utilisation des protéines et acides aminés

Le problème fondamental, suite à une agression thermique, est l'augmentation marquée de la dégradation des protéines. Les mécanismes spécifiques responsables de ce

phénomène ne sont pas encore clairs, mais les hormones de stress, les cytokines et les oxydants y jouent pour beaucoup. Il est certain que le taux d'afflux cellulaire des acides aminés excède l'influx. Ce phénomène se produit même en présence d'un support nutritionnel adéquat quand les acides aminés ne sont pas requis comme source d'énergie. Au niveau nutritionnel, dans un état soumis à un stress, les acides aminés constitueront jusqu'à 25% des calories totales de la diète et moins de 5% si on considère un état de famine seulement (Larsson *et al.*, 1990).

La diminution inévitable des acides aminés intracellulaires après la brûlure semble être un signal qui augmente le catabolisme pour le rétablissement du niveau des acides aminés cellulaires, menant à un processus d'exécution autonome de perte de protéines cellulaires. Ces dérèglements reflètent des altérations à plusieurs niveaux : source d'énergie corporelle métabolique, synthèse des protéines de la phase aiguë et protéines servant à la réparation des tissus (Le Boucher et Cynober, 1997). Les variations des concentrations plasmatiques d'acides aminés illustrent l'équilibre entre le relâchement périphérique (muscle) et l'utilisation qu'en font les viscères et les plaies, dépendant du stade de la réponse à la brûlure (Cynober, 1989). Tôt après la brûlure, dans la phase aiguë, il se produit une hyperaminoacidémie, spécialement pour la glycine, l'hydroxyproline, la phénylalanine, la lysine, l'alanine et la glutamine. Ces phénomènes résultent probablement de processus comme la destruction des tissus et la protéolyse des muscles (Cynober, 1989).

Après la brûlure, des quantités importantes d'alanine, d'arginine, de glutamine et de leucine sont oxydées. L'alanine est utilisée principalement pour la production de glucose. L'arginine, la glutamine et la leucine sont des acides aminés clé dans un série de voies métaboliques et ceux-ci deviennent des acides aminés conditionnellement essentiels suite à une brûlure (Demling et Seigne, 2000). La glutamine est un acide aminé critique utilisé dans un grand nombre de voies métaboliques (voir tableau II), et la déficience en glutamine après la brûlure est bien reconnue (Gore et Jahoor, 1994).

Tableau II. Fonctions clé de la glutamine

Fonctions métaboliques
➤ Navette pour l'azote : clairance d'urée et d'ammoniaque
➤ Source directe d'énergie cellulaire
Anabolisme : anticatabolisme
➤ Diminution de la dégradation des protéines
➤ Facteur limitant le taux de croissance des muscles
➤ Stimule le relâchement de l'hormone de croissance humaine
Effet sur la guérison des plaies
➤ Carburant direct pour les fibroblastes et les macrophages
➤ Préserve la perte de masse maigre de façon indirecte
Préserve l'intégrité de l'intestin
➤ Carburant primaire pour les entérocytes via l'action antioxydante du glutathion
Fonctions immunitaires
➤ Améliore l'action bactéricide des neutrophiles et est un carburant pour les lymphocytes
Antioxydant
➤ Substrat pour l'antioxydant cellulaire et plasmatique clé, le glutathion

(Demling et Seigne, 2000)

2.1.1.4 Anormalité des micronutriments

Il est de plus en plus évident que des différences importantes se produisent au niveau du métabolisme des micronutriments suite à des brûlures graves à cause d'une augmentation des pertes, d'une consommation durant le métabolisme et d'un remplacement inadéquat. Comme les micronutriments sont essentiels pour les fonctions cellulaires, des déficiences amplifient les dérangements déjà sévères induit par la brûlure et le catabolisme en cours (Demling et DeBiasse, 1996).

Les micronutriments incluent les composés organiques et inorganiques, c'est-à-dire les vitamines et les minéraux. Ces composés sont utilisés et excrétés à un taux plus rapide après la brûlure, menant à des déficiences bien documentées. Les dosages présentement recommandés pour le remplacement des micronutriments après la brûlure sont dix fois plus élevés que les dosages des rations journalières, avec des plus grandes doses de vitamines C, E, A et du zinc. Des vérifications fréquentes sont nécessaires pour les composés comme le calcium, le magnésium et le phosphate (Demling et Seigne,

2000). Les déficiences les plus fréquemment retrouvées suites à des brûlures importantes sont décrites dans le tableau III.

Tableau III. Déficiences en micronutriments après la brûlure

Micronutriment	Fonction métabolique
Vitamines hydrosolubles	
Thiamine (vitamine B ₁)	Décarboxylation oxydative
Riboflavine (vitamine B ₂)	Transfert d'électrons durant la phosphorylation oxydative
Niacine (vitamine B ₃)	Dinucléotide nicotinamide-adénine ; réaction de transfert d'électrons
Acide pantothénique	Partie du coenzyme A
Biotine	Réactions de transfert de dioxyde de carbone
Pyridoxine (vitamine B ₆)	Réactions de transamination et de décarboxylation
Acide folique	Réaction de transfert d'un carbone
Cobalamine (vitamine B ₁₂)	Production de réaction de méthionine coenzyme A
Acide ascorbique (vitamine C)	Antioxydant du cytosol ; synthèse de collagène ; production de carnitine
Vitamines liposolubles	
Vitamine A (rétinol)	Synthèse de rhodopsine ; stimulant inflammatoire des cellules épithéliales et de la croissance des os ; guérison des plaies
B-Carotène	Pro-vitamine A ; antioxydant potentiel
Vitamine E	Antioxydant des membranes cellulaires
Minéraux	
Cuivre	Développement des tissus conjonctifs par la réticulation du collagène ; pour l'utilisation du fer ; pour la céruloplasmine
Manganèse	Formation de la substance de base du pro-collagène ; Fonction cérébrale ; fonction neuromusculaire ; synthèse des acides gras
Sélénium	Antioxydant et requis pour le métabolisme des lipides
Zinc	Métabolisme de l'énergie ; formation du collagène ; synthèse des protéines ; prolifération de l'épithélium

(Demling et Seigne, 2000)

2.1.1.5 Modulation des désordres métaboliques

Même si la nature exacte des facteurs initiant l'hypermétabolisme post-brûlure demeure mal défini, les altérations neurohormonales semblent à la fois responsables de l'initiation de la réponse métabolique et de l'influence sur la disposition et l'utilisation

des substrats énergétiques. Les hormones cataboliques, c'est-à-dire les catécholamines, les glucocorticoïdes et le glucagon jouent un rôle important dans le développement de l'hypermétabolisme, car leurs concentrations plasmatiques sont d'au moins 2 à 4 fois au dessus des niveaux usuels, avec les plus hautes concentrations étant observées durant la première semaine après la brûlure (Wolfe *et al.*, 1987).

Selon une étude de Wilmore, Long *et al.* (1974), les catécholamines sont responsables de l'hypermétabolisme médié par une brûlure grave. Par contre, dans d'autres études, les catécholamines et les corticostéroïdes semblent avoir un effet minimal au niveau des anomalies métaboliques puisque l'hypercatabolisme persiste chez des rats brûlés suite à une ablation des glandes surrénales ou durant un blocage β -adrénergique ou des glucocorticoïdes (Clark *et al.*, 1984). Cependant, une relation entre le cortisol et l'hypermétabolisme a été démontrée par Cynober *et al.* (1982) et il a été reporté que l'augmentation du catabolisme des protéines, induite par la brûlure, était en partie médiée par les glucocorticoïdes (Fand *et al.*, 1995). Des altérations hormonales additionnelles, identifiées par un nombre important d'investigateurs, incluent une augmentation frappante des niveaux de glucagon (Wilmore, Lindsey *et al.*, 1974).

La réponse hormonale, face à la brûlure, n'est pas seulement caractérisée par une augmentation de la production des hormones cataboliques, mais aussi par une production inefficace d'hormones anaboliques. La production de médiateurs anaboliques est inadéquate et associée à une résistance à l'insuline; la réponse de l'hormone de croissance est, de plus, diminuée (Wolfe *et al.*, 1979 ; Jeffries et Vance, 1992). Le ratio molaire insuline/glucagon, qui est considéré comme un régulateur de la disposition et de l'utilisation des substrats énergétiques, est caractérisé sous la normale avec un retour graduel à un niveau normal pour les deux hormones chez les patients qui poursuivent un guérison de leurs plaies sans complications.

Il a été reporté que les prostaglandines n'étaient pas responsables du catabolisme des protéines induit par la brûlure (Clark *et al.*, 1984). Selon une autre étude, les cytokines seraient responsables du catabolisme des protéines musculaires après la brûlure,

spécialement l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α dont les actions se chevaucheraient jusqu'à un certain point (Baracos, 1990).

2.2 Réponse immunitaire

Pour bien comprendre ce qui se passe chez un grand brûlé, au niveau du système immunitaire, il est important d'explorer les bases de la réponse immunitaire normale qui s'effectue en plusieurs étapes. Lorsqu'un agent pathogène s'introduit dans le corps humain, il doit réussir à franchir plusieurs barrières. La première barrière est une barrière mécanique, c'est la peau ou les muqueuses. Ensuite, se retrouve le système immunitaire non-spécifique. C'est la défense initiale lors d'une invasion bactérienne parce qu'elle ne requiert pas d'exposition antérieure à l'antigène invasif pour être activée, elle peut donc agir immédiatement (Griswold, 1993). Le troisième niveau de défense, qui est le plus efficace, est fourni par les composantes du système immunitaire spécifique. Ce système est basé sur la mémoire immunologique acquise des cellules B et à la suite d'une présentation d'antigènes, assurée par des cellules présentatrices professionnelles (cellules présentatrices d'antigènes = APC), il en résulte une phase effectrice médiée par la production d'anticorps spécifiques ou par des cellules d'activité cytotoxique (Griswold, 1993).

Lorsqu'un pathogène réussit à s'infiltrer, la première ligne de défense s'active, c'est-à-dire, la réponse non-spécifique. Cette réponse implique des composantes cellulaires et humorales (non-cellulaires). Des substances produites au niveau local alertent le système immunitaire et préparent la structure sur laquelle certaines composantes de ce système fonctionneront. Les cellules endothéliales et les fibroblastes vont sécréter de la fibronectine. Les mastocytes et les macrophages vont sécréter plusieurs substances comme la cascade du complément, des amines vasoactives agissant au niveau local et des molécules chimiotactiles qui attireront les neutrophiles de la circulation sanguine aux endroits où les tissus sont endommagés (Griswold, 1993).

Un des éléments du système non-spécifique est le système du complément. Il est appelé de cette façon, car il complémente l'action des anticorps. C'est l'un des principaux moyens par lesquels les anticorps spécifiques aux bactéries peuvent les détruire. Les individus ayant une déficience de C3, une des composantes centrale du système du complément, sont sujets à des infections bactériennes répétées, comme les individus qui ont des déficiences au niveau des anticorps (Taylor *et al.*, 1998). Le système du complément comporte une vingtaine de protéines solubles qui sont sécrétées principalement par le foie et qui circulent dans le sang et les fluides extracellulaires. La plupart sont inactives jusqu'au moment où elles sont activées par les anticorps fixés sur un hôte étranger, ou plus directement par un microorganisme envahissant. Le résultat de l'activation du complément mène à une augmentation de la perméabilité vasculaire, à une attraction des leucocytes et à leur mobilisation au site de l'inflammation, à une augmentation de la phagocytose et à la lyse des cellules étrangères (Haeney, 1998).

Le complément peut être activé par trois voies différentes: la voie classique, la voie alterne ou la voie des lectines liant les mannanes (*mannan-binding lectin* = MBL) (Taylor *et al.*, 1998). La voie classique est principalement activée par des anticorps liés à des antigènes, ce qu'on appelle des complexes immuns. La voie alterne est activée par la liaison directe de la composante C3 à des pathogènes, en absence d'anticorps. Finalement, la voie des MBL, qui a été découverte récemment, est initiée par la liaison des MBL à des groupes de mannose, présents sur plusieurs parois cellulaires bactériennes. Les trois voies mènent au clivage de C3, la composante centrale du complément, qui joue à la fois un rôle d'opsonine (protéine qui augmente la reconnaissance par les cellules phagocytaires d'une particule étrangère), et d'activation des protéines lytiques, connue comme le complexe d'attaque de la membrane (*membrane attack complex* = MAC), (Taylor *et al.*, 1998).

Au niveau de la réponse non-spécifique, un des éléments cellulaires des plus importants, est le recrutement des neutrophiles. Ces cellules effectuent, entre autres, la phagocytose et la flambée oxydative qui ont pour but de neutraliser les microorganismes

envahissants. Les neutrophiles sécrètent aussi des chémokines, molécules qui attireront les autres leucocytes au site d'infection (Griswold, 1993).

Toujours au niveau de la réponse non-spécifique, le macrophage/monocyte est le type de cellule qui initie plusieurs des réponses de l'hôte face à un traumatisme. L'activation du macrophage peut engendrer l'initiation d'un mécanisme local de coagulation pour circonscrire l'envahissement par les pathogènes. Elle peut aussi promouvoir la sécrétion de leucotriènes et de facteurs activateurs des plaquettes (*platelet activating factor* = PAF), augmenter l'adhérence des leucocytes, augmenter la présentation d'antigènes, induire la sécrétion de substances chimiotactiles et promouvoir la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires incluant l'IL-1, l'IL-6, le TNF- α et l'interféron α et β (INF- α et INF- β) (O'Sullivan et O'Connor, 1997). Les macrophages effectuent aussi la phagocytose, ce qui joue un rôle important au niveau de la réponse spécifique, ce sera exploré un peu plus loin.

Le système immunitaire est capable de faire la différence entre ce qui nous est étranger et ce qui nous appartient (le soi et le non-soi) grâce à des molécules particulières, contenues dans les membranes cellulaires. Ce système implique donc l'élimination des bactéries ou autres particules étrangères en les recouvrant d'anticorps. Les composantes cellulaires majeures sont les macrophages, les lymphocytes T et B, et les plasmocytes (cellules B produisant activement des anticorps). La partie cruciale de ce système est l'activation et l'efficacité des lymphocytes B (Griswold, 1993). Ce système est très complexe. En plus des anticorps qui sont des opsonines majeures, il y a les cytokines qui sont des substances produites par les cellules de ce système. Les cytokines établissent un réseau complexe de communication pour augmenter et coordonner la défense contre les pathogènes et pour influencer la production d'anticorps (Griswold, 1993). L'activation des lymphocytes B pour la production d'anticorps en réponse à des antigènes bactériens est le résultat de réactions complexes entre macrophage, lymphocytes T et lymphocytes B (Griswold, 1993).

La première étape dans l'immunité spécifique, c'est la présentation de l'antigène. En résumé, cette action consiste à phagocyter les microorganismes non-désirables, les digérer avec des enzymes protéolytiques et, ensuite, à prendre les petites particules digérées, les transporter vers la membrane cellulaire et, enfin, les exprimer à la surface de cette membrane (Janeway, 1997). Les cellules qui présentent ces antigènes se nomment des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et elles le font dans un contexte très particulier. Cette présentation se fait grâce à l'emboîtement parfait de trois structures moléculaires: le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), l'antigène, et un récepteur complexe fixé sur la paroi du lymphocyte, le récepteur des cellules T (TCR). Ces trois pièces doivent s'emboîter parfaitement pour que la réaction immunitaire puisse avoir lieu (Janeway, 1997). Les macrophages activent les lymphocytes T par la présentation de leurs antigènes et par la production d'IL-1.

Selon Griswold (1993), il y a au moins deux types de macrophages, l'inhibiteur et le facilitateur, dépendant de leurs actions sur le système immunitaire. Les macrophages facilitateurs sont synonymes de CPA, ils sont recrutés et maintenus actifs via l'interféron- γ . Le macrophage inhibiteur impose une rétroaction négative sur l'interaction macrophage facilitateur-lymphocyte T auxiliaire. Le lymphocyte T suppresseur est activé simultanément avec l'induction de l'interaction lymphocyte T auxiliaire-lymphocyte B. Le lymphocyte T suppresseur joue donc un rôle de rétroaction négative pour réduire ou contrebalancer la stimulation de la transformation des lymphocytes B en plasmocytes. C'est donc cette balance, entre les macrophages facilitateurs-lymphocytes T auxiliaires et les macrophages inhibiteurs-lymphocytes T suppresseurs, qui prend toute son importance déterminant ainsi l'homéostasie globale des réponses spécifiques et non-spécifiques du système immunitaire.

Les lymphocytes T activés sécrètent des médiateurs chimiques qui vont stimuler deux sous-populations: Les lymphocytes T auxiliaires, qui déclenchent la cascade des réactions immunitaires, et les lymphocytes T suppresseurs, qui sont chargés de maintenir cette réaction dans certaines limites et d'y mettre fin lorsqu'elle n'a plus raison d'être (Janeway, 1997). Les lymphocytes activés produisent, entre autres, de l'interleukine-2

(IL-2), ce qui donne un signal de prolifération autocrine et paracrine aux lymphocytes T et B (Griswold, 1993). À l'aide de multiples médiateurs chimiques, les lymphocytes T auxiliaires provoquent la prolifération de nombreuses cellules possédant le récepteur correspondant à un antigène spécifique toutes génétiquement identiques, qui constituent ce que l'on appelle un clone (c'est le phénomène de sélection clonale) (Janeway, 1997). Au cours de cette phase de différenciation, la réponse immunitaire est mémorisée dans les lymphocytes T spécialisés, dont la durée de vie est très longue. C'est grâce à eux qu'une substance étrangère s'introduisant une deuxième fois dans l'organisme sera reconnue, même de nombreuses années plus tard (Janeway, 1997).

L'importance des messages médiés par les cytokines ne doit pas être sous-estimée. Les cytokines sont essentielles non seulement pour la coordination de la réponse spécifique, mais aussi pour la communication entre les cellules des systèmes non-spécifiques et spécifiques. La participation continue des macrophages dans l'interaction macrophage-lymphocyte T ne peut être maintenue que par la production de cytokines. (Griswold, 1993).

2.3 La réponse inflammatoire

Lors de brûlures importantes, les complications sont causées, en partie, par un mauvais fonctionnement du système immunitaire résultant en une immunosuppression et par un risque accru de septicémie provoquant ainsi une défaillance des organes vitaux (Schwacha *et al.*, 1998). Quand le processus de l'inflammation se met en branle, il implique alors de multiples changements dans la régulation de plusieurs gènes amenant ainsi la sécrétion d'une quantité importante de médiateurs chimiques entraînant une cascade d'événements complexes que les chercheurs essaient d'élucider.

Le syndrome de la réponse inflammatoire systémique constitue un problème majeur chez les grands brûlés. Cependant, le mécanisme exact par lequel de telles blessures mènent au SRIS n'est pas encore établi (O'Sullivan et O'Connor, 1997). Certains chercheurs suggèrent la théorie du «deux-chocs» (*the « two-hit » theory*) où le

choc initial serait la brûlure elle-même qui servirait à stimuler les monocytes/macrophages et les lymphocytes. Le second choc serait n'importe quelle autre infection ou stimulus qui résulterait en une réponse inflammatoire extrêmement exagérée, causant la lyse des cellules et le relâchement de grandes quantités de métabolites toxiques. Un relâchement excessif de cytokines provoque un "empoisonnement de cytokines" menant à des dommages tissulaires graves et à des défaillances multiples au niveau des organes (O'Sullivan et O'Connor, 1997). Donc cette réponse inflammatoire exagérée de la part de l'hôte ne peut pas mener à une élimination efficace des agents infectieux, elle peut plutôt contribuer à un état de désactivation immunitaire qui a été nommé le syndrome de la réponse compensatoire anti-inflammatoire (*compensatory anti-inflammatory response syndrome* = CARS) (Weiss *et al.*, 1999).

Le syndrome de dysfonction polyviscérale (*multiple organe dysfunction syndrome* = MODS) est étroitement relié au SRIS. Certains prétendent que ce phénomène est causé par l'inflammation elle-même plutôt que par la surcroissance des bactéries, car il est souvent difficile de démontrer que les bactéries et leurs toxines sont directement impliquées dans la génération du MODS ou SRIS (Goris, 1996).

L'inflammation devrait être un processus local. Un lot de facteurs bactériens et non-bactériens peuvent causer l'inflammation incluant des blessures tissulaires. Les blessures et les brûlures endommagent les cellules et ceci mène à exposer du collagène et de l'adénosine triphosphate (ATP) extracellulaire qui sont des activateurs puissants de la voie alternative du système du complément (Goris, 1996). L'inflammation locale est biochimiquement caractérisée par l'activation du complément, l'activation des polymorphonucléaires (PMN), le relâchement d'enzymes protéolytiques, la formation de radicaux libres (par exemple : myéloperoxydase, lipofuscine, peroxyde) et le relâchement de cytokines : TNF, IL-1 et IL-6. Chez les patients avec le MODS et le SRIS, il a été démontré que tous ces produits sont présents dans la circulation systémique en concentration anormalement élevée et que leur apparition précède le développement des symptômes et des signes cliniques (Roumen *et al.*, 1995 ; Waydhas *et al.*, 1992).

Le problème du SRIS et du MODS semble résider dans la stimulation excessive ou la réaction excessive du système de réponse inflammatoire face à une variété de stimuli bactériens ou non-bactériens. Chez des patients avec une péritonite, par exemple, un traitement optimal du processus infectieux (régimes variés d'antibiotiques et administration d'anticorps monoclonaux contre des endotoxines) peut ou pas éliminer complètement la source d'infection. Mais, c'est la réponse inflammatoire exagérée causée par l'infection qui génère le MODS/SRIS et non l'infection à elle seule. Cette réponse inflammatoire généralisée peut subséquemment se perpétuer elle-même, même après la résolution complète de la péritonite. Le MODS/SRIS devient ainsi un processus autonome. Quand ces patients décèdent, ce n'est pas à cause de l'infection incontrôlée et envahissante, mais bien parce qu'ils sont victimes de leur propre réponse inflammatoire déclenchée en premier lieu par l'infection (Goris, 1996).

2.4 La translocation bactérienne

Les brûlures sévères produisent un choc physiologique et induisent un dérangement gastro-intestinal aigu qui peut altérer l'intégrité de la muqueuse intestinale et faciliter la translocation bactérienne vers les ganglions lymphatiques du mésentère, ou du foie ou de la rate (Chen *et al.*, 1999). La translocation bactérienne se définit par le passage de bactéries viables à travers le tractus gastro-intestinal vers les ganglions lymphatiques mésentériques et en périphérie (Fukushima *et al.*, 1992). Ce phénomène explique donc que les endotoxines comme les lipopolysaccharides (LPS) sont fréquemment responsables du second choc (O'Sullivan et O'Connor, 1997). Chez les patients brûlés, le tractus gastro-intestinal peut servir de réservoir primaire à des bactéries qui pourraient causer des infections menaçantes pour la survie du patient (Griswold, 1993). La présence d'endotoxines active les cellules du système immunitaire, ce qui favorise le relâchement de TNF, IL-1, IL-6, IL-8, de prostaglandines et radicaux libres. Les actions de ces médiateurs résultent en une circulation hyper-dynamique, une diminution de résistance vasculaire et de pression artérielle menant à une immunosuppression généralisée (O'Sullivan et O'Connor, 1997). La translocation de bactéries ou d'endotoxines est de plus en plus reconnue pour être une cause potentielle

des infections systémiques et du choc septique, de l'hypermétabolisme et le MODS chez les patients brûlés (Fukushima *et al.*, 1994).

2.5 La réponse immunitaire et la brûlure

Après une brûlure, la peau, qui est une barrière protectrice, est perdue. Ce phénomène favorise donc les infections. Le succès des mécanismes immunitaires à limiter l'infection dépend de plusieurs facteurs incluant une exposition précédente de l'hôte aux microorganismes envahissants, la virulence, le taux de croissance et la production de toxine de l'organisme lui-même (Heideman et Bengtsson, 1992). Chez les patients brûlés, on observe une dépression du système immunitaire autant au niveau de la réponse cellulaire qu'humorale. Les effets de cette dépression sont induits, en partie, par la sécrétion de plusieurs produits tels que des quinines, des prostaglandines, des anaphylatoxines, des superoxydes et des leucotriènes, ce sont toutes des substances qui influencent la réponse inflammatoire lors d'une agression thermique (Heideman et Bengtsson, 1992).

2.5.1 Effets sur la réponse non-spécifique

Le mauvais fonctionnement des neutrophiles est un élément fondamental des anomalies du système immunitaire non-spécifique chez les grands brûlés. Les neutrophiles présents dans la circulation et ceux qui effectuent la margination (accolement des leucocytes à la face interne des parois vasculaires lors d'un ralentissement de la circulation, précédant et favorisant la diapédèse) en réponse à une blessure subissent une soudaine augmentation de leur activation. Il y a une altération des récepteurs de surface face aux chimioattracteurs et pour l'adhérence endothéliale (Griswold, 1993). Les cellules deviennent "collantes", permettant l'adhérence à l'endothélium rapidement, et souvent bien avant l'arrivée au site de la blessure. Il y a formation d'amas de cellules et obstruction des petits vaisseaux. Cet accolement inapproprié des neutrophiles à la face interne des parois vasculaires diminue la quantité

de neutrophiles disponibles pour la défense dans les endroits où ils sont le plus nécessaires (Griswold, 1993).

La phagocytose, les fonctions bactéricides et le métabolisme oxydatif des neutrophiles, se retrouvent diminués immédiatement après la brûlure et peut durer un certain temps (Griswold, 1993). Les granules primaires ou azurophiles, dans le cytoplasme des neutrophiles, utilisées pour tuer les bactéries, suite à la phagocytose, démontrent une augmentation marquée au niveau de l'activité hydrolytique des enzymes comme les élastases, les protéases, les lysozymes et les myéloperoxydase, immédiatement après la brûlure. Ce phénomène est rapidement suivi par l'incapacité de maintenir cette activité ou de produire de nouveaux enzymes, rendant ainsi impossible l'élimination des organismes phagocytés (Griswold, 1993). Les granules secondaires, contenant des lactoferrines et d'autre chélateurs de fer avec les lysozymes se fusionnent habituellement avec la membrane externe du neutrophile pendant l'excitation de la cellule, déversant leur contenu dans le milieu environnant. C'est la dégranulation. Ces substances servent alors à diminuer la croissance bactérienne et dégrader les tissus, aidant ainsi la migration des neutrophiles dans les tissus.

Pour prédire le risque d'infection chez les grands brûlés, des essais *in vitro* ont été effectués. Il a été noté, lors de ces tests, qu'après une brûlure importante, se produit une soudaine dégranulation des neutrophiles, suivie d'une inaptitude à former d'autres granules et à les fusionner avec la membrane externe. Une diminution de l'activité des enzymes, dans ces granules secondaires, est également constatée (Griswold, 1993). Toutes ces anomalies mènent à une incapacité à maintenir une réponse inflammatoire prolongée et nécessaire. Un manque de réponse à une réaction d'hypersensibilité retardée est universel après la brûlure (Griswold, 1993).

Un grand nombre de chercheurs ont reporté des déficiences chez les neutrophiles périphériques du sang après des brûlures importantes, incluant une mauvaise absorption phagocytaire, une activité bactéricide altérée, une diminution de la migration et de la chimiotaxie, une oxydation de glucose et une consommation d'oxygène diminuées, une

production de H_2O_2 réduite et une perte ou une déféctuosité d'enzymes lysosomales (Babcock *et al.*, 1990). Selon une étude menée par Ogle et son équipe (1990), les fonctions du neutrophile peuvent être supprimées pour plusieurs mois après la brûlure et un patient peut avoir une faible fonction bactéricide, même si le relâchement de superoxydes est normal.

La brûlure provoque l'activation du complément, élément important dans la réponse non-spécifique (Bengtsson et Heideman, 1987). Les anaphylatoxines C3a et C5a vont influencer la pression sanguine, la microcirculation, l'extravasation des fluides et le comportement des leucocytes (Hugli, 1984). Les anaphylatoxines vont aussi induire le relâchement d'histamine chez les mastocytes et les basophiles. L'augmentation du niveau plasmatique d'histamine a été observée suite à des brûlures sévères (Yurt et Pruitt, 1986). La dernière partie de la cascade du complément, le complexe attaquant la membrane, attaque non seulement l'antigène reconnu par les anticorps, mais attaque aussi les cellules proches du point d'activation qui ne sont pas reliées au processus initial de l'activation. Ce phénomène de lyse réactive a été observé en association avec l'hémolyse et l'anémie chez les patients en septicémie et ce type de cytolyse pourrait être une explication à l'anémie observée avant que la septicémie n'ait lieu chez les patients ayant des brûlures profondes (Bengtsson et Heideman, 1988).

2.5.2 Effets sur la réponse spécifique

La présence de brûlures provoque le relâchement de substances qui affectent le système non-spécifique, ce qui semble jouer un rôle majeur dans la suppression de la réponse spécifique du système immunitaire. Il a été démontré que des prostanoïdes immunosuppresseurs, comme les prostaglandines E_2 , diminuaient l'activité de plusieurs messagers, comme les cytokines et en particulier l'interleukine-12 (IL-12) (Griswold, 1993). Ils diminuent aussi la production de cytokines par les macrophages et les lymphocytes T. L'histamine interfère avec la flambée oxydative des neutrophiles et supprime la prolifération des lymphocytes T auxiliaires. Le facteur stimulant les colonies (*colony stimulating factor* = CSF), normalement produit par les macrophages pour

augmenter la production de neutrophiles au niveau de la moelle osseuse, est significativement diminué après la brûlure (Griswold, 1993).

Chez des grands brûlés, les fonctions des macrophages/monocytes, composante importante du système immunitaire spécifique, sont altérées. L'initiation de la réponse inflammatoire locale stimule les mastocytes et les macrophages à produire des quantités excessives de substances ayant un effet vasoconstricteur qui peut faire augmenter l'ischémie des tissus. Une diminution des fonctions des macrophages occasionnée par des brûlures sévères pourrait être en partie responsable pour les déficiences subséquentes de l'immunité cellulaire et humorale (O'Sullivan et O'Connor, 1997).

2.5.2.1 Atteinte à la réponse humorale

L'un des médiateur de la réponse immunitaire spécifique menant à la défense de l'hôte contre les infections, est la production d'anticorps. Une diminution d'immunoglobulines IgA, IgD, IgG et IgM a été observée chez les patients brûlés, une semaine après la brûlure, avec un retour à un niveau normal vers la fin de la deuxième semaine (Heideman et Bengtsson, 1992). Les IgGs sont les anticorps les plus importants pour l'opsonisation des pathogènes Gram positifs et Gram négatifs. Des baisses significatives de la production de toutes les sous-classes d'IgG sont en corrélation avec la mortalité reliée à la septicémie et peuvent être utilisées comme indicateur de pronostic (O'Sullivan et O'Connor, 1997). L'activation de lymphocytes B à produire des anticorps en réponse à des antigènes est le résultat d'interrelations complexes entre les macrophages, les lymphocytes T et les lymphocytes B. Les fonctions des macrophages et des lymphocytes T sont altérées par la brûlure et ceci affecte inévitablement l'efficacité des lymphocytes B (Griswold, 1993).

2.5.2.2 Influences au niveau de la réponse cellulaire

Après une brûlure, la présentation d'antigène et la production de cytokines par les macrophages sont altérées et ceci résulte en une activation inadéquate des lymphocytes T.

La population de macrophages inhibiteurs et de lymphocytes T suppresseurs est significativement augmentée après la brûlure et ceci a un impact majeur sur l'activation et la production d'anticorps des lymphocytes B. L'augmentation de ces sous-populations engendre une dépression de la synthèse de certains médiateurs régulateurs positifs comme l'IL-1, l'IL-2 et l'interféron- γ (Griswold, 1993).

Les monocytes expriment les antigènes du CMH de classe II, ils jouent un rôle crucial dans la présentation d'antigène aux lymphocytes T auxiliaires. Il a été démontré que des changements dans l'expression des antigènes du CMH de classe II sur les monocytes indiquent le développement d'infections suite à une chirurgie majeure (Spittler *et al.*, 1995). Il a aussi été démontré que les taux de rémission et de mortalité parmi les patients ayant des infections sont reliés au niveau d'expression de la molécule de HLA-DR (Spittler *et al.*, 1995).

Le déficit immunologique, chez les patients brûlés, est attribué en partie à la réduction de la population des lymphocytes T, l'augmentation de l'activité cellulaire des cellules T suppresseurs, la présence de facteurs suppresseurs dans le sérum et la suppression de cytokines de synthèse et l'expression de récepteurs cellulaires (Barlow, 1994). Lors d'une expérience chez la souris, l'équipe de Organ *et al.* (1989) a démontré qu'il y avait une diminution de la quantité de lymphocytes totaux durant les premiers 6 jours après la brûlure, après quoi, la rate, les ganglions cervicaux et les ganglions drainant les brûlures ont démontré une augmentation continue de leur nombre de lymphocytes. Par contre, la quantité de lymphocytes présents dans certains tissus lymphopoïétiques, c'est-à-dire, le thymus, la moelle osseuse et, dans une moindre mesure, les ganglions mésentériques, est demeurée réduite pendant longtemps dans la période post-brûlure (48-60 jours).

Il est possible que la séquestration des lymphocytes, dans des compartiments lymphoïdes et particulièrement dans les ganglions lymphatiques, soit la conséquence des changements dans la circulation cellulaire, c'est-à-dire, une augmentation des entrées et une diminution des sorties plutôt qu'une prolifération *in situ*. Ce phénomène est connu

sous le nom de « *lymphocyte trapping* », trappage de lymphocytes (Barlow, 1994). Dans une étude de Organ *et al.*, (1989) chez des rats brûlés, il y a eu une diminution de lymphocytes dans la moelle osseuse et le thymus quelques jours après la brûlure, possiblement dû à un recrutement massif de lymphocytes immatures à partir de la moelle osseuse. La diminution de la réponse des lymphocytes a été attribuée sommairement à un manque de maturité fonctionnelle des lymphocytes circulants dans la période post-brûlure (Barlow, 1994).

Il a été démontré que la brûlure diminue le ratio de cellules T auxiliaires ($CD4^+$) sur cellules T suppresseurs ($CD8^+$). Les chercheurs ne savent pas si ce phénomène est dû à une diminution de cellules $CD4^+$ et à une augmentation de cellules $CD8^+$ ou plutôt à une redistribution de ces cellules dans différents compartiments du corps (O'Mahony *et al.*, 1985). La production de cytokines par les lymphocytes T auxiliaires est un élément essentiel aux fonctions immunitaires normales. Cette population de cellules englobe plusieurs sous-groupes, un des plus importants est le type 1 (Th1) ou 2 (Th2). Ces sous-populations diffèrent dans leur profil de production de cytokines.

2.5.2.3 Effets sur la différenciation des lymphocytes T, Th1 ou Th2 ?

Quand un lymphocyte T auxiliaire est activé, il se différencie selon un profil de réponse, soit de type 1, soit de type 2. Le sous-groupe de Th1 sécrète préférentiellement de l'IL-2 et de l'INF- γ , tandis que le sous-groupe de Th2 sécrète de l'IL-4, de l'IL-10 et de l'IL-13 (Utsunomiya *et al.*, 2001). Une prédominance de type Th1 provoque une augmentation des lymphocytes cytotoxiques impliqués dans la réponse cellulaire et les cellules NK "Natural Killer". Ainsi, une déféctuosité de la réponse de type Th1 contribue à rendre les patients brûlés plus susceptibles à certains pathogènes (Utsunomiya *et al.*, 2001). Une prédominance de type Th2 conduit vers une augmentation de PGE₂ et d'immunoglobuline de type IgE résultant en une réaction d'inflammation chronique pouvant endommager les tissus (O'Sullivan et O'Connor, 1997).

Certaines observations suggèrent que la brûlure déclenche une réduction de la réponse de type 1; ce phénomène est démontré par la diminution d'IL-2 et d'INF- γ sécrétés par les cellules T (Wood *et al.*, 1984). Une augmentation concomitante de production d'IL-4 et d'IL-10 par les cellules T après la brûlure a aussi été bien documentée. Ces phénomènes suggèrent que les cellules des patients brûlés subissent une activation de la réponse et des fonctions du type 2 (Groux *et al.*, 1996 : Abbas *et al.*, 1996).

Les mécanismes responsables du changement de production de cytokines par les cellules T ne sont pas encore très bien compris. Cependant, il est reconnu que la différenciation des sous-populations de cellules T auxiliaires est initiée par l'activation d'un antigène à travers le récepteur des cellules T (TCR) avec une exposition précoce à des cytokines telles que IL-12, INF- γ , IL-4, IL-6 et IL-10 agissant comme facteur de différenciation de sous-populations de lymphocytes T auxiliaires (Groux *et al.*, 1996 : Abbas *et al.*, 1996). Utsunomiya et son équipe (2001) expliquent que l'IL-12 est une cytokine qui joue un rôle très important dans la différenciation des cellules T naïves en cellules T de type 1 et elle agit comme un co-stimulus pour une production maximale d'INF- γ par les cellules T déjà différenciées en cellules de type 1. Ils ont aussi démontré que des souris brûlées ne relâchaient pas d'IL-12 dans leur circulation sanguine même si elles avaient été stimulées avec des lipopolysaccharides (LPS). Ceci indique que les réponses de type 1 ne sont pas établies de façon adéquate chez les individus ayant subi des brûlures graves. Les brûlures sévères sont habituellement associées avec la production de cytokines de type 2, la production massive de corticostéroïdes et une augmentation marquée des taux des PGE₂ (Utsunomiya *et al.*, 2001). Ces trois facteurs sont reconnus comme étant des inhibiteurs de production d'IL-12 (Larsson et Linden, 1998 ; Matsuo *et al.*, 1996 ; van der Pouw Kraan *et al.*, 1995 ; Wu *et al.*, 1998).

2.5.2.4 Anergie des lymphocytes T

D'autres chercheurs suggèrent que l'immunosuppression, suite à un trauma majeur, est plus souvent due à une dysfonction des monocytes qu'à une dysfonction des

lymphocytes T (Miller-Graziano *et al.*, 1988). Les mécanismes suggérés concernant le manque de réponse général des cellules T sont l'anergie, la déplétion apoptotique des cellules T répondantes, et/ou l'augmentation de la production de lymphokines immunosuppressives (provenant des cellules T) (Parijs et Abbas, 1998).

L'anergie des cellules T se développe dans une petite sous-population de patients sévèrement blessés (De *et al.*, 1997). Cette anergie des cellules T n'est pas le résultat d'un changement de la production de cytokines de type Th1 vers le type Th2, puisque la production des deux types de lymphokines, de type 1 (IFN- γ , IL-2) et de type 2 (IL-10, IL-4), a été simultanément diminuée aux niveaux de la protéine et de l'ARNm (De *et al.*, 2000). L'éventuel échec de la cellule T anergique stimulée à proliférer, même en présence d'un apport supplémentaire d'IL-2 exogène, ou même suite à une induction par de la PMA + ionomycine, suggère une défectuosité au niveau des voies de transduction de signal des cellules T conséquence avec un blocage de la transduction de signal. L'échec à augmenter la régulation de l'expression du CD25 s'accorde aussi avec l'hypothèse d'un blocage dans les voies d'activation des cellules T (Matsushita et Nishimura, 1997 ; Boussiotis *et al.*, 1997).

De et son équipe (2000) ont démontré que des patients traumatisés présentaient des cellules T anergiques qui étaient viables et dont la régulation de l'expression du CD11b était augmentée, suggérant que ce n'était pas l'ensemble de la synthèse de protéine qui était bloquée. L'augmentation de l'expression du CD11b, indiquant des cellules T hautement activées, pouvait aussi indiquer une cellule T exprimant un MHC classe II avec un potentiel pour une présentation d'antigène aberrante et une immunosuppression (De *et al.*, 2000).

2.6 Importance du support nutritionnel

La nutrition et l'immunologie sont le foyer de la révolution scientifique. La nourriture fournie comme source de nutriments a évolué de façon spectaculaire depuis

les deux derniers siècles, mais jamais auparavant, elle n'a été une telle promesse pour l'innovation.

À cause de toutes ces perturbations métaboliques et des problèmes au niveau de l'absorption des nutriments, de la perte de protéine et de masse maigre, certains chercheurs ont consacré beaucoup de leur énergie à trouver une façon d'atténuer tous ces phénomènes en adaptant une diète spéciale aux patients. L'importance de l'administration de niveaux au-dessus de la normale en protéines et calories à des patients sévèrement brûlés a été reconnue pour la première fois en 1945. Depuis ce temps, plusieurs études ont reporté les effets bénéfiques de diètes élevées en calories et en protéines pour les individus brûlés (Alexander *et al.*, 1980; Curreri *et al.*, 1974; Wilmore *et al.*, 1971). Les patients brûlés ont besoin d'une quantité personnalisée d'énergie et de protéines pour accélérer la synthèse de protéines viscérales et musculaires et aussi pour réduire la protéolyse (Wolfe, 1996). Parce que les besoins en énergie des patients brûlés sont spécifiques et qu'ils varient beaucoup durant la phase de récupération, les dépenses d'énergie de base devraient être déterminées chaque semaine par calorimétrie indirecte (Cunningham *et al.*, 1989).

La voie d'administration de la diète a aussi des effets sur l'état du patient. L'administration par voie entérale est préférée à la voie parentérale, car elle permet le maintien de la trophie du tractus gastrointestinal en promouvant le relâchement d'hormones intestinales et de facteurs de croissance (Kudsk *et al.*, 1992). La voie entérale permet aussi l'administration d'un support plus balancé et individualisé, et élimine les problèmes de contamination par les cathéters. Les patients gravement malades qui reçoivent un support nutritionnel par voie parentérale expérimentent plus de complications infectieuses (Kudsk *et al.*, 1992).

2.6.1 Études de l'importance des lipides

Selon Mochizuki (1984), quelques investigateurs (Meguid *et al.*, 1982; Nordenstrom *et al.*, 1983), durant les années 80, ont recommandé un taux de lipides

autour de 30% des calories de la diète chez des sujets humains. Mochizuki et son équipe ont mené des études sur des cochons d'Indes qui ont démontré clairement que 5 à 15% de lipides dans leur diète était optimal et constituait probablement une équivalence par rapport aux sujets humains. En 1987, Gotschlich et Alexander publient un article ne recommandant pas plus de 10 à 15% de lipides dans la diète de patients humains brûlés. Une autre étude, menée Garrel *et al.* en 1995, a démontré que l'administration d'une diète faible en lipides (15%) administrée chez des humains brûlés, en comparaison avec un groupe contrôle (35% de lipides), avait favorisé une diminution de l'incidence de pneumonie, une fonction respiratoire améliorée, une amélioration plus rapide du statut nutritionnel, un profil métabolique meilleur et une durée de soins plus courte. Une autre étude, menée sur des souris brûlées, a démontré que l'administration d'une diète faible en lipide (1%) était suffisante pour prévenir les déficiences en acides gras essentiels, qu'elle améliorait les fonctions immunitaires et qu'elle prévenait l'induction excessive d'un stress oxydatif suite à la brûlure (Jobin *et al.*, 2000a). Ceci démontre que les opinions ont changé depuis le début des années 80 et qu'un taux de lipides plus bas semble favorable aux sujets brûlés.

D'autres chercheurs ont effectué des recherches sur le type de lipides administré dans la diète. Les résultats expérimentaux d'Alexander (1986) et de Trocki (1987) supportent l'idée qu'une diète riche en acides eicosapentanoïques (ω -3) a des effets bénéfiques sur la réponse inflammatoire et immunitaire chez les grands brûlés. Son équipe a observé des glandes surrénales plus petites, des niveaux plus bas de C3 (éléments faisant partie de la cascade du complément) dans le sérum et un taux métabolique plus bas, suggérant moins de stress inflammatoire, chez les animaux alimentés avec des huiles de poissons (élevé en ω -3) en comparaison avec les animaux alimentés avec de l'huile de tournesol ou de l'acide linoléique (élevée en ω -6). Il ont aussi observé une amélioration de la réponse immunitaire et une masse musculaire améliorée chez les animaux alimentés avec les huiles de poisson, suggérant une production réduite de PGE₂ ou d'autres médiateurs ayant des effets immunosuppresseurs et une synthèse protéique améliorée.

Les acides gras provenant de la diète modulent la composition en phospholipides des membranes cellulaires et par le fait même, la quantité et le type d'eicosanoïdes synthétisés. Les acides gras non-estérifiés dérivés des phospholipides dans les tissus sont métabolisés par des cyclooxygénases engendrant la formation de prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes et par des lipoxygénases formant des leukotriènes et des acides hydroyeicosatétraenoïques (Hwang, 1989). La modification du ratio (ω -3)/(ω -6) des acides gras dans la diète a des effets sur la réponse inflammatoire et immunologique. Ces mêmes effets furent initialement attribués aux modifications dans les types de prostaglandines, leukotriènes et thromboxanes synthétisés parce que l'acide eicosapentanoïque (ω -3) qui est le substrat préféré des leucocytes compétitionne avec l'acide arachidonique (ω -6) (Hwang, 1989). Certains dérivés de l'acide arachidonique produits par la cyclooxygénase et la lipoxygénase participent à une réponse inflammatoire exagérée et réduisent la réponse immunologique suite à la brûlure.

2.6.2 Importance de la glutamine

Parmi les suppléments nutritionnels les plus fréquemment utilisés, il y a aussi les acides aminés. En effet, il a été rapporté que l'ajout de certains acides aminés comme l'ornithine α -cétoglutarate, l'arginine et la glutamine pouvaient améliorer la condition des patients brûlés ou ayant subi un trauma (Gennari et Alexander, 1997; Gianotti *et al.*, 1993; Le Boucher *et al.*, 1997; Le Boucher *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 1987). Cependant, l'acide aminé le plus reconnu pour ses effets bénéfiques dans un état de stress ou de trauma, est la glutamine.

La glutamine est l'acide aminé le plus abondant dans le plasma des mammifères, elle est transportée et métabolisée activement dans presque tous les tissus. Parce qu'elle est synthétisée *de novo*, elle a été désignée comme un acide aminé non-essentiel. Cependant, des évidences récentes suggèrent que ceci pourrait être une fausse désignation. Même si le corps a normalement de grandes réserves de glutamine et qu'il peut la synthétiser en grandes quantités, des états cataboliques comme une chirurgie majeure, un trauma, une septicémie ou une brûlure sont caractérisés par une

consommation de glutamine par le corps entier à des taux qui excèdent la production maximale de glutamine. Donc, si le stress persiste, une profonde déplétion en glutamine se développe et peut contribuer à un résultat malheureux. Ainsi le terme acide aminé "conditionnellement essentiel" a été récemment appliqué à la glutamine (Labow *et al.*, 2000).

2.6.2.1 Importance métabolique de la glutamine

Une des raisons qui explique son taux de renouvellement aussi rapide est que la glutamine est utilisée dans un large éventail de fonctions métaboliques. Même si la glutamine est utilisée différemment dans divers tissus et sous des conditions physiologiques variées, ces fonctions à l'intérieur de la cellule se séparent généralement en quatre catégories (Labow *et al.*, 2000):

- son rôle de transport d'azote
- son importance dans le maintien de l'état d'oxydoréduction de la cellule
- sa position comme intermédiaire métabolique
- et son rôle comme source d'énergie

2.6.2.2 Rôle du transport de l'azote

Approximativement un tiers de toute l'azote, dérivée du métabolisme des protéines, est transporté dans le sang sous forme de glutamine (Souba, 1987). Cette "navette d'azote" fournit des moyens de transport non-toxique de l'ammoniaque, de la périphérie vers les viscères. Le métabolisme de la glutamine est distribué de façon hétérogène à travers le foie, avec la consommation de la glutamine via la glutaminase qui est concentrée dans les hépatocytes périportaux et la synthèse de glutamine via la glutamine synthétase située dans les hépatocytes périveineux. Cette distribution procure au foie un élégant mécanisme pour détoxiquer le sang de l'ammoniaque pendant que la glutamine contribue aux provisions systémiques (Haussinger, 1986). L'utilisation de la glutamine comme navette d'azote est aussi important dans l'excrétion des déchets azotés et dans la maintenance de l'homéostasie acide-base. Les reins utilisent un isoenzyme de glutaminase typique du rein pour hydrolyser la glutamine et générer de l'ammoniaque

pour l'excrétion dans l'urine (Deferrari *et al.*, 1994). Cette glutaminolyse est responsable de la plupart de l'excrétion d'azote dans l'urine et la disponibilité de l'ammoniaque facilite l'excrétion des surplus d'acides en les conjuguant avec des ions H^+ , générant ainsi des ions ammonium pour l'excrétion (Nissim *et al.*, 1985).

2.6.2.3 Contrôle de l'oxydoréduction cellulaire

Il y a une évidence considérable qui suggère que la glutamine joue un rôle clé dans la régulation de la synthèse du glutathion (Meister et Anderson, 1983). Le glutathion est un tripeptide composé de glutamate, cystéine, et glycine; il représente la source majeure d'équivalent de réducteur cellulaire et protège la cellule contre les agressions oxydatives (Meister et Anderson, 1983). Le rôle de la glutamine dans la synthèse du glutathion suppose que la disponibilité de ce nutriment peut avoir de profondes répercussions sur le contrôle du redox cellulaire. Chez un patient ayant subi une chirurgie, où le stress oxydatif peut augmenter, l'importance de la glutamine disponible peut être amplifiée.

2.6.2.4 Intermédiaire métabolique

La glutamine est aussi une source importante de carbone et d'azote pour les intermédiaires métaboliques et la synthèse macromoléculaire. La glutamine est utilisée directement pour la synthèse des protéines et sert de précurseur dans la synthèse d'autres acides aminés (Jepson *et al.*, 1988). Elle fait aussi partie intégrale de la synthèse des acides nucléiques, participant à la production des nucléotides de purines et pyrimidines (Abcouwer *et al.*, 1996). La synthèse des acides gras et, par extension, des membranes phospholipidiques est aussi aidée par des intermédiaires métaboliques dérivés de la glutamine. En plus de son rôle dans la synthèse macromoléculaire, la glutamine peut aussi être utilisée dans la synthèse de cofacteurs importants comme la glucosamine et le dinucléotide nicotinamide adénine (NAD^+) et utilisée pour la gluconéogenèse dans le rein et le foie durant des périodes de famine (Curthoys et Watford, 1995).

2.6.2.5 La glutamine, source d'énergie

L'oxydation de la glutamine peut aussi générer de l'ATP pour la respiration cellulaire; et, en fait, la glutamine sert de "carburant respiratoire primaire" dans certaines cellules comme les entérocytes et les lymphocytes. Le montant total d'énergie cellulaire dérivé de la glutamine dépend de son degré d'oxydation et du taux d'utilisation de la glutamine. Ces facteurs dépendent largement des quantités absolues et des proportions relatives de glutamine et de glucose disponibles autant que le type et l'état de prolifération de la cellule (Darcy-Vrillon et al., 1994). Sous des conditions physiologiques, l'oxydation de la glutamine représente le tiers de la production cellulaire d'ATP et ce, dans plusieurs types de cellules en culture (Lazo, 1981; Mares-Perlman et Shrago, 1988; Spolarics *et al.*, 1991). En général, la quantité relative d'oxydation de la glutamine augmente quand les niveaux de glucose baissent (Krutzfeldt et al., 1990).

2.6.2.6 Importance au niveau du tractus gastrointestinal

L'importance de la glutamine circulante pour le maintien des fonctions et l'intégrité de l'intestin a été illustrée dans plusieurs études. Hwang et ses collègues ont démontré que des solutions parentérales enrichies de glutamine ont augmenté la hauteur de la muqueuse du jéjunum, le contenu en ADN et ont atténué de façon significative l'atrophie des villosités associée avec la nutrition parentérale totale (O'Dwyer *et al.*, 1987). D'autres ont démontré la capacité des diètes intraveineuses ou entérales, enrichies en glutamine, à augmenter la hauteur de villosités, le contenu de la muqueuse en azote et à stimuler la croissance de la muqueuse suite à un état de famine (Barber et Jones, 1990; Grant et Snyder, 1988; Salloum *et al.*, 1989).

En plus de supporter son intégrité structurale, il est clair que la glutamine affecte aussi de nombreuses activités biochimiques de l'intestin comme l'augmentation de l'activité de la glutaminase et le transport d'acides aminés à travers la bordure en brosse du jéjunum (Klimberg et Souba, 1990; Salloum et al., 1990). La glutamine semble, plus particulièrement, avoir plusieurs influences bénéfiques sur les fonctions immunitaires du

petit intestin. Il a été démontré qu'une diète enrichie en glutamine diminue l'adhérence bactérienne sur les entérocytes pendant qu'elle maintient des population de cellules T et B dans la *lamina propria* de l'iléum terminal (Burke et al., 1989). Ainsi, les effets de la glutamine sur la translocation bactérienne peuvent être reliés à une combinaison de l'augmentation de l'intégrité de la muqueuse intestinale et des fonctions immunitaires améliorées de l'intestin.

2.6.2.7 Implication au niveau du système immunitaire

La glutamine est essentielle à des fonctions immunitaires cellulaires et humorales convenables, c'est-à-dire qui seront assez efficaces pour défendre le corps contre toute atteinte de proportion normale. Des études sur la culture de tissus ont démontré que le manque de supplément de glutamine dans les milieux de culture limite sévèrement l'habileté des lymphocytes à répondre à une stimulation mitogénique (Taudou *et al.*, 1983). La diminution de la prolifération des lymphocytes durant une déplétion de glutamine peut être reliée à son utilisation comme précurseur pour la biosynthèse des nucléotides et comme source d'énergie. Chez des macrophages complètement différenciés, la glutamine est essentielle pour la transcription de gènes, menant à la sécrétion de protéines, durant une stimulation antigénique et pour la synthèse de phospholipides qui supporte l'activité de la membrane cellulaire lors de la pinocytose ou la phagocytose (Parry-Billings et al., 1990). Cependant, il a été établi que les macrophages et les lymphocytes sont incapables de synthétiser la glutamine dont ils ont besoin et ainsi, ils dépendent d'un apport exogène qui, en présence de basses concentrations plasmatiques, sera insuffisant (Newsholme, 1996).

Une basse concentration de glutamine inhibe la prolifération des lymphocytes induite par un mitogène ou un anticorps anti-TCR, elle diminue la fonction phagocytaire des macrophages, réduit la différenciation des lymphocytes B en cellules plasmatiques et inhibe la génération de lymphokines produites par des cellules tueuses (killer cells) activées (Ardawi et Newsholme, 1985; Griffiths et Keast, 1990; Wallace et Keast, 1992). Les besoins exogènes de glutamine sont confinés à des évènements tardifs dans

l'activation des cellules T, comme l'expression des récepteurs d'IL-2, des marqueurs d'activation de surface comme le p55 IL-2R, le CD45RO et le CD71 (Hörig *et al.*, 1993). Une basse concentration en glutamine induit la diminution de l'expression de plusieurs molécules cellulaires de surface exprimées sur des macrophages comme les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (HLA-DR), les molécules d'adhésion intercellulaire (CD54), le récepteur Fc pour les IgG (CD64) et les récepteurs du complément (CD11/CD18) (Spittler *et al.*, 1995). L'addition de glutamine *in vitro* à des neutrophiles de patients brûlés, restaure leurs fonctions bactéricides (Ogle *et al.*, 1994).

2.6.2.8 Expériences et essais cliniques sur la glutamine

Il y a eu un nombre important d'études effectuées sur des animaux, supportant l'ajout de glutamine dans les solutions nutritives. Ziegler et Young (1997) ont noté que 80 % des études animales jusqu'à aujourd'hui démontrent des effets bénéfiques au niveau des suppléments de glutamine. Les données démontrant un effet positif sur les résultats obtenus avec des humains sont beaucoup plus limités. Il a été démontré pour la première fois en 1992, par Ziegler *et al.*, que la glutamine a des effets cliniques bénéfiques chez les humains. Dans cette étude réalisée en double-aveugle de façon aléatoire, des patients greffés de moelle osseuse ont reçu un type de nutrition par voie parentérale. Il y a eu trois types de diètes: une supplémentée de glutamine, une autre supplémentée avec un mélange d'acides aminés isoazoté et la troisième était isocalorique et sans glutamine. Les patients dans le groupe supplémenté avec de la glutamine ont eu moins d'infections (3/24 vs 9/21 dans le groupe contrôle; $p = 0.041$) et un temps d'hospitalisation plus court. L'incidence de colonisation microbienne a aussi été significativement réduite. Une autre étude effectuée par Schloreb et Amare (1993), avec des patients ayant subi une transplantation de moelle osseuse, a démontré une diminution de la durée de soins dans le groupe qui recevait la diète enrichie en glutamine. Des effets bénéfiques sur la supplémentation en glutamine ont été rapportés chez des patients gravement malades dans une étude menée par Griffiths et ses associés (1997). Les patients qui ne pouvaient pas recevoir une nutrition par voie entérale ont reçu une formule avec un supplément de glutamine ou un mélange isoazoté et

isocalorique. Les patients ayant reçu la glutamine ont eu une espérance de vie améliorée de 6 mois (24/42 vs 14/42; $p = 0.049$).

Quelques expériences ou essais cliniques ont démontré les effets bénéfiques de la glutamine chez des patients traumatisés. Ils ont tous démontré des améliorations au niveau biochimique ou immunologique. En voici quelques exemples. Hammarqvist (1989) a démontré qu'un supplément de glutamine dans la nutrition parentérale, chez des patients ayant subi une opération au niveau abdominal avait des effets bénéfiques. Comparativement au groupe contrôle, trois jours après l'opération, le supplément de glutamine engendre une augmentation de la glutamine libre dans le muscle, inhibe la chute de synthèse protéique et améliore la balance azotée. Dans d'autres études de supplémentation des glutamine effectuées sur des humains, des améliorations de la balance azotée, une augmentation de l'absorption des nutriments et une préservation de la muqueuse intestinale ont été démontrées (Stehle *et al.*, 1989; Tremel *et al.*, 1994; Van der Hulst *et al.*, 1993). Selon Houdijk et ses collègues (1998), l'ajout de glutamine, dans une diète administrée par voie entérale, diminue la fréquence de pneumonies, de septicémie et de bactériémie chez des patients sévèrement traumatisés. Une autre étude effectuée par Wilmore (2001) sur des patients ayant subi une opération électorale après des blessures accidentelles démontre que la glutamine administrée par voie intraveineuse semble avoir des effets positifs.

Une étude sur les grands brûlés a été menée très récemment par Wischmeyer et son équipe (2001). Cette étude a été effectuée sur 26 grands brûlés pour étudier certains effets d'un supplément de glutamine par voie intraveineuse (parentérale). La distribution des patients a été faite de façon aléatoire et en double-aveugle. Les patients recevaient leur diète normale par voie entérale avec une administration de glutamine ou d'un mélange isoazoté par voie intraveineuse. Les résultats obtenus ont démontré que le supplément de glutamine par voie entérale a réduit l'incidence de bactériémie Gram-négative, diminué l'inflammation globale, et amélioré le statut nutritionnel chez les patients gravement brûlés. Les suppléments de glutamine ont aussi mené à des

diminutions non-significatives de cultures sanguines positives et à une moindre consommation d'antibiotiques par patient.

2.7 Projet d'étude

En étudiant l'implication de la glutamine, autant au niveau du métabolisme que du système immunitaire et en observant les résultats positifs obtenus lors de différentes expérimentations, il était devenu impératif d'entreprendre une étude sur les effets de la glutamine chez les grands brûlés. Il nous semblait évident que la glutamine pouvait être bénéfique sur l'état de santé des grands brûlés.

Il est à noter qu'aucune étude *in vivo* n'avait été effectuée sur les patients brûlés et la glutamine avant celle de Wischmeyer (2001). De plus, le protocole de ce chercheur est différent de celui que nous avons utilisé, car l'administration du supplément de glutamine s'est faite par voie entérale dans notre projet et par voie parentérale (intraveineuse) dans le leur. Un autre facteur nous motivait: l'expérimentation avec une si grande cohorte des patients pour tester les effets de la glutamine. Donc lorsque le protocole a été établi, nous étions les premiers à pouvoir étudier les effets d'un supplément de glutamine, administré par voie entérale, chez des sujets humains gravement brûlés et avec un si grand nombre de sujets.

Les hypothèses de départ étaient que l'administration, par voie entérale, de glutamine à des patients brûlés améliorerait les fonctions immunitaires et diminuerait l'occurrence des infections. Plus précisément, elle provoquerait une augmentation de l'activité phagocytaire des neutrophiles et une amélioration dans les sous-populations de leucocytes. Le résultat global de ces améliorations se démontrerait aussi par une diminution de la durée des soins, du taux de mortalité et de morbidité.

Chapitre 3

Matériel et méthodes

3.1 Patients et soins des patients

Les sujets ont été 38 patients adultes avec des brûlures entre 20% et 80% de l'aire de la surface du corps (n'incluant pas les brûlures du 1^{er} degré), admis au Centre des Grands Brûlés à l'Hôtel-Dieu de Montréal dans les 24 heures suivant les brûlures, entre janvier 1999 et mai 2001. Les patients étaient âgés entre 18 et 65 ans, et les critères d'exclusion étaient les suivants : index de masse corporelle plus élevé que 30, grossesse, maladie du foie, défaillance rénale, maladies gastro-intestinales chroniques, cancer et immunodéficience reconnue. L'étude s'est faite selon un processus en double-aveugle. Les patients ont été distribués de façon aléatoire parmi deux groupes, c'est-à-dire un groupe placebo (recevant un mélange d'acides aminés) et un groupe recevant de la glutamine (26 gr/jour) comme supplément nutritif. Pour faire en sorte d'obtenir des groupes homogènes en respect de la taille de la brûlure, une stratification avec trois catégories a été utilisée : cat. 1 : 20-40%, cat. 2 : 41-60%, cat. 3 : 61-80%. Une table de distribution aléatoire a été utilisée pour chacune des catégories, ce qui a produit deux groupes avec un nombre similaire de patients dans chaque catégorie de sévérité de brûlure. Les infirmières et les chirurgiens n'étaient pas informés dans quel groupe les patients étaient distribués. La formule de Parkland avec la solution de lactate Ringer a été utilisée pour la réhydratation des patients.

À chaque jour des infirmières étaient chargées de faire des prélèvements sanguins pour déterminer la formule sanguine des patients. Le débridement (opération chirurgicale qui consiste à enlever tous les tissus nécrosés au site de la brûlure) et les premières greffes de peau ont été effectuées dans les sept jours suivant l'admission des patients. À l'exception des mains, les brûlures étaient laissées à l'air libre, sans pansements et sans onguent antiseptique jusqu'au moment de la greffe. La douleur des patients a été calmée

par l'administration intraveineuse de morphine: l'infusion continue était accompagnée par l'administration de bolus durant les procédures thérapeutiques douloureuses, le tout suivant un protocole pré-établi et standardisé. La plupart des patients ont été intubés de façon préventive et ventilés de façon artificielle.

3.1.1 Support nutritionnel

Le support nutritionnel a commencé dans les 24 heures suivant l'admission des patients. Les solutions entérales ont été administrées grâce à un tube naso-entéral (Entube, Duluth, GA) inséré avec un guidage endoscopique. Les solutions entérales ont été administrées par une pompe péristaltique pour assurer une administration continue avec peu de pression. Tous les patients ont été nourris avec Sandosource (Novartis, Minneapolis, MN). Des solutions parentérales ont été données par un cathéter branché sur une veine centrale, contenant un mélange d'acides aminés et de dextrose ; le mélange le plus utilisé était de 6.5% d'acides aminés, 20% dextrose (Vamine, Clintec, Mississauga, Ontario, Canada). Les besoins énergétiques ont été calculés selon la formule de Curreri ($40 \times \% \text{ TBSA brûlée} + 25 \times \text{poids corporel [kg]}$) avec des mesures bihebdomadaires de dépenses énergétiques au repos par calorimétrie indirecte (Moniteurs Deltatrac, Sensormedics, Anaheim, CA). Les proportions d'énergie en lipides et glucides dans la diète administrée étaient respectivement de 15% et 60% du total des besoins en énergie. Une explication plus détaillée sur la composition de la formule entérale est exposée dans le tableau IV.

Tableau IV. Composition de la formule entérale (quantité/L)

Éléments	Unité	Quantité	Éléments	Unité	Quantité
Vitamine A	(IU)	4230	Chlore	(mg)	1590
Vitamine D	(IU)	340	Calcium	(mg)	1340
Vitamine E	(IU)	64	Phosphore	(mg)	1070
Vitamine C	(mg)	250	Magnésium	(mg)	300
Vitamine B ₁	(mg)	3.2	Fer	(mg)	1.5
Vitamine B ₂	(mg)	3.6	Iode	(mg)	0.14
Niacine	(mg)	42	Cuivre	(mg)	1.6
Vitamine B ₆	(mg)	4.2	Zinc	(mg)	1.2
Acide Folique	(mg)	0.34	Manganèse	(mg)	4.4
D-Panathénique	(mg)	21.1	Choline	(mg)	42
Vitamine B ₁₂	(µg)	12.7	Protéine	(g)	62.5
Vitamine K	(mg)	0.10	Lipide	(g)	38.9
Biotine	(mg)	0.25	Acide Linoléique	(g)	19
Sodium	(mg)	690	Acide Linoléique	(g)	0.2
Potassium	(mg)	1500	Glucide	(g)	100

3.1.2 Suppléments de glutamine

La glutamine, administrée par voie entérale, a été donnée sous forme de glycyl-glutamine (Cambridge Neutraceutical, Boston, MA), en quatre bolus de 10 grammes, toutes les 6 heures, c'est-à-dire 40 g/jour, ce qui correspond à 26 grammes de glutamine. La glycyl-glutamine était diluée dans de l'eau juste avant son administration. Les patients du groupe témoin ont reçu une quantité équivalente de glycine à celle des patients du groupe glutamine, plus un mélange d'acides aminés non-essentiels pour que le supplément soit iso-azoté. Ainsi, les deux groupes ont reçu la même quantité de glycine. Les produits ont été achetés chez Fujinimoto Inc.

3.2 Préparation des cellules sanguines

La présente étude s'est échelonnée sur une période de 28 jours. Les prélèvements sanguins ont été effectués aux jours 4, 7, 14, 21 et 28 du protocole ou jusqu'à ce que le patient n'ait plus besoin du support nutritionnel par voie entérale (avant le jour 28). Le sang a été recueilli dans des tubes VACUTAINER™ en verre stériles contenant un mélange de sodium-héparine (143 unités USP) (Becton Dickinson, NJ)

Les tubes ont été centrifugés à 200 x g pendant 10 minutes et, ensuite, le plasma (couche supérieure) a été prélevé pour des tests ultérieurs. Les globules rouges ont été éliminés par un traitement avec une solution de lyse hypertonique, (NH_4Cl 0.155M, KHCO_3 0.1 mM, Na_2EDTA 0.1mM) (Fisher Scientific) pour un volume final de 50ml, pendant 10 minutes. Suite à une deuxième centrifugation, le culot récolté a subi deux lavages avec une solution de HBSS (Hanks' balanced salt solution) (Sigma, St. Louis, MO) supplémentée avec 0.1% d'albumine de sérum bovin (*bovine serum albumin* = BSA) (Sigma). Un compte des cellules viables a été effectué à l'aide d'un hématimètre et d'un colorant physiologique, le bleu de trypan (Sigma), pour ajuster la concentration cellulaire des leucocytes à 5×10^6 cellules/ml dans une solution de HBSS + 0.1% BSA. C'est avec ces leucocytes que tous les tests ont été effectués.

3.3 Technique de cytométrie en flux

La cytométrie en flux a été utilisée pour la génération des données de ce projet. C'est un outil particulièrement bien adaptée pour effectuer des analyses portant sur un grand nombre de cellules puisqu'il est possible d'en analyser plusieurs milliers en quelques secondes. Les paramètres cellulaires, qui sont le plus souvent mesurés par un cytomètre en flux, sont: la grosseur, la forme, la granularité, le contenu en protéines, le contenu en ADN, le pH intracellulaire et la concentration de calcium. Le terme cytomètre en flux est souvent utilisé comme synonyme de FACS[®] (*fluorescence activated cell sorter*) (Becton Dickinson, NJ).

Les cytomètres en flux utilisent une organisation sophistiquée de lasers optiques, et de détecteurs électroniques et fluidiques pour mesurer la dispersion de la lumière et/ou de la fluorescence des cellules en suspension qui sont hydrodynamiquement concentrées à une colonne de flux laminaire de la largeur d'une seule cellule. Cette colonne passe à travers un laser convergé sur un rayon d'un diamètre de quelques cellules de large. Lorsque chaque cellule passe à travers la lumière du laser, cela émet de la lumière dispersée dans toutes les directions. La lumière dispersée, mesurée à 90 degrés de l'incidence (SSC – *Side Scattered*), correspond à la quantité de structures granulaires à l'intérieur d'une cellule alors que celle mesurée à 180 degrés (FSC – *Forward Scattered*) correspond approximativement à la grosseur de la cellule. Ces paramètres suffisent à distinguer de nombreux types cellulaires et à exclure des cellules mortes, des agrégats et des débris cellulaires des cellules d'intérêt.

Les cellules peuvent être colorées avec une variété de colorants ou fluorochromes qui lient les protéines ou les acides nucléiques, ou avec des colorants dont de spectre de l'émission de fluorescence change habituellement avec les variations de concentration en ion, calcium ou hydrogène. Pour identifier des protéines spécifiques, des colorants fluorescents comme la fluorescéine (FITC) ou la phycoérythrine (PE) sont attachés avec des liens covalents à des anticorps monoclonaux qui ne se lieront qu'aux cellules exprimant la protéine contre laquelle les anticorps auront été formés. La lumière des

différentes longueurs d'onde émanant des colorants choisis est simultanément captée par des filtres et elle est dirigée vers différents photodétecteurs. Le cytomètre peut détecter jusqu'à cinq longueurs d'onde de façon simultanée en plus de l'information sur la dispersion de la lumière (FSC et SSC).

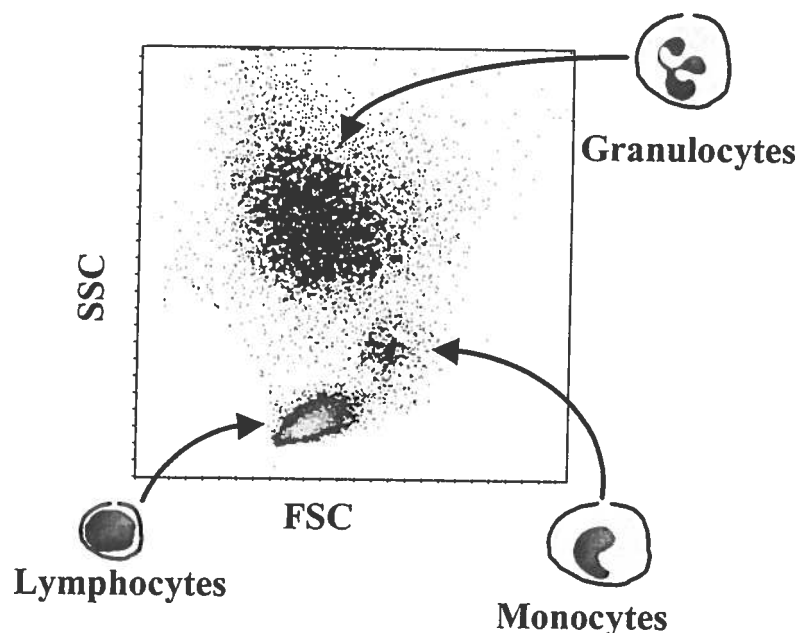


Figure 1. Discrimination de différentes populations cellulaires selon la dispersion de la lumière.

3.4 Phagocytose

Le protocole de phagocytose provient d'une adaptation du protocole de Schiff et son équipe (1997). La phagocytose a été effectuée avec des bactéries du type *Staphylococcus Aureus* couplées à de la fluorescéine provenant de chez Molecular Probes (Eugene, OR). Les bactéries (115 μg) ont été lavées avec la solution de HBSS + BSA 0.1%, puis, ensuite soniquées (5 fois 15 secondes avec pause de 10 secondes) dans 50 μl de cette solution. Pour faciliter le processus de phagocytose, les bactéries ont été opsonisées pendant 45 minutes à 37°C en milieu humide avec 5% de CO_2 . L'opsonisation facilite le processus de phagocytose; elle a été effectuée grâce à 200 μl de

sérum humain (dilué $\frac{1}{4}$ dans du PBS) et 200 μ l de solution de HBSS + 0.1% BSA qui a été ajouté au 50 μ l initial de bioparticules soniquées. Après l'incubation il était important de faire une seconde sonication de la solution bactérienne. Ensuite, 100 μ l de cette solution a été ajoutée à 1ml de la suspension cellulaire de leucocytes (1×10^6 cell/ml), puis, il y a eu une incubation de 30 minutes sur un rotateur à 37°C en milieu humide supplémenté de 5% de CO₂. La réaction de phagocytose a été arrêtée avec 100 μ l d'une solution d'azide (20mM EDTA, 5% azide de sodium, pH 7.3) et le tube déposé sur de la glace jusqu'à la lecture sur le cytomètre en flux. Une lecture a été effectuée et ensuite, pour éliminer toute fluorescence causée par la présence de particules non-phagocytées, 100 μ l de bleu de trypan a été ajouté avant une seconde lecture. Ce colorant physiologique a comme propriété d'éteindre la fluorescence des molécules de fluorescéine captée par le cytomètre. C'est ce qui permettait alors d'obtenir la fluorescence provenant des particules phagocytées à l'intérieur des cellules, là où le colorant n'avait pas accès, car le bleu de trypan est un colorant supravital qui est exclu activement de la cellule vivante.

La technique de phagocytose a été optimisée. Plusieurs tests ont été effectués afin de trouver les conditions optimales de phagocytose. Les conditions optimales qui ont été déterminées sont: l'étape d'opsonisation des bactéries, les meilleurs temps d'incubation et les quantités de bactéries à utiliser dans la suspension cellulaire. Les temps d'incubation utilisés pour la phagocytose ont été de 30 et 60 minutes, et deux quantités de bactéries ont été sélectionnées pour chacun des temps d'incubation. Les données présentées dans ce mémoire, sont celles considérées optimales, c'est-à-dire un temps de phagocytose de 30 minutes et 50 μ l du mélange de bactéries opsonisées.

3.5 Flambée oxydative

La flambée oxydative a été mesurée selon la méthode de Bass *et al.* (1983), à l'aide d'une sonde moléculaire fluorescente qui peut être détectée avec la méthode de cytométrie. Cette molécule de H₂DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescéine diacétate)

(Molecular Probes) devient fluorescente quand elle subit une oxydation dans les cellules phagocytaires.

Une suspension cellulaire de leucocytes (1×10^6 cellules/ml) a été incubée avec une concentration finale de $5 \mu\text{M}$ de H_2DCFDA à 37°C en milieu humide avec 5% de CO_2 pendant 15 minutes. Ensuite, une concentration finale de $1.5 \mu\text{M}$ de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acétate) a été ajoutée à cette suspension et une seconde incubation a été effectuée pendant 45 minutes à 37°C en milieu humide avec 5% de CO_2 . Les analyses au cytomètre en flux ont été effectuées dans les dix minutes suivant l'incubation.

La flambée oxydative est un moyen d'évaluer l'efficacité des phagocytes. Les cellules qui ont effectué la phagocytose de micro-organismes produisent normalement une explosion dans le métabolisme oxydatif, qui aide à détruire les pathogènes engloutis, avec la génération de radicaux d'oxygène toxiques. Il y a plusieurs techniques qui ont été développés pour l'évaluation de l'activité de l'explosion oxydative. Les cellules ont été incubées avec un composé non-fluorescent, le $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (2',7'-dichlorofluorescéine diacetate). Ce composé est saisi par les cellules et désacétylé par des estérases intracellulaires pour produire un autre composé non-fluorescent, le H_2DCF , qui est une molécule polaire trappée dans le cytoplasme des cellules. L'incubation avec du PMA provoque ensuite l'explosion oxydative qui génère des composés réactifs d'oxygène qui convertissent le H_2DCF en DCF , molécule émettant de la fluorescence brillante dans le spectre du vert. Le cytomètre peut efficacement mesurer la fluorescence de milliers de cellules en un temps très court, ce qui constitue un avantage parmi les autres techniques qui sont plus subjectives.

3.6 Potentiel mitochondrial

Le potentiel mitochondrial a été détecté à l'aide de la rhodamine 123. La méthode utilisée est semblable à une des méthodes présentée dans l'article de Shapiro (2000). Comme ce colorant physiologique est spécifiquement concentré dans les mitochondries à cause du potentiel transmembranaire que ces organelles maintiennent dans les cellules

vivantes, la rhodamine 123 est une bonne sonde pour observer l'activité mitochondriale. Pour cet essai, 200 μ l de la suspension initiale de leucocytes (5×10^6 cellules/ml) à été ajouté à 700 μ l de solution de HBSS + 0.1% de BSA et 100 μ l de rhodamine 123 1 μ M pour être incubé à 37°C en milieu humide avec de 5% de CO₂ pendant 30 minutes. Les analyses au cytomètre en flux ont été effectuées dans les dix minutes suivant l'incubation.

Le potentiel mitochondrial, in situ, est un indicateur sensible de l'état énergétique de la cellule. La rhodamine 123 a été utilisée pour effectuer des essais afin d'évaluer cet état énergétique cellulaire. La rhodamine 123 est accumulée dans les mitochondries des cellules vivantes, ceci étant un résultat du potentiel transmembranaire. Ainsi, l'incubation de cellules avec la rhodamine 123 résulte en une coloration des cellules vivantes, pendant que les cellules mortes qui ont des mitochondries déchargées, démontrent une accumulation minime de rhodamine 123. C'est donc en évaluant l'intensité de la fluorescence de la rhodamine que l'on peut déterminer l'état énergétique des cellules.

3.7 Thiols

La méthode utilisée ici provient d'une adaptation du protocole de Zurgil *et al.* (1999). Les thiols des leucocytes totaux du sang ont été mesurés avec du 5-chlorométhylfluorescéine diacétate (CMFDA) (Molecular Probes), un colorant stable fluorescent qui réagit avec les thiols et qui peut différencier les thiols cellulaires de petit poids moléculaire. Avec cette sonde, la concentration en thiols reflète les sulfhydryles de petits poids moléculaires qui sont prépondérants dans le glutathion. Donc la fluorescence obtenue est représentative de la quantité de glutathion dans la cellule. Pour cette expérience, la suspension de leucocytes a été ajustée à 1×10^6 cellules/ml dans du HBSS + 0.1% de BSA. La sonde CMFDA a été ajoutée à cette suspension (5 μ M) et le tout a été incubé pendant 10 minutes à 37°C pour être ensuite, immédiatement analysé au FACScan.

Le glutathion (L- γ -glutamyl-L-cystényl-glycine) est un tripeptide qui est présent dans presque toutes les cellules animales et il est le composé intracellulaire prédominant contenant des thiols de petit poids moléculaire. C'est l'antioxydant le plus abondant dans

la cellule, il est retrouvé sous deux formes: réduite (GSH) et oxydée (GSSG). Son action protectrice est basée sur l'oxydation des thiols sur son résidu cystéine avec la formation du GSSG, qui est, à son tour, catalytiquement réduit par la glutathion réductase, pour finalement retourner à sa forme avec thiol (GSH) (Ghibelli et al., 1998). C'est pour cette raison que l'évaluation des thiols s'est faite grâce à une sonde fluorescente qui se colle aux thiols de petit poids moléculaire. L'intensité de la fluorescence, au niveau des résultats, représente la quantité de thiols présents dans les cellules analysées.

3.8 Phénotypage

La méthode utilisée pour cette étude est la même utilisée précédemment pour notre équipe (Jobin *et al.*, 2000b). La suspension cellulaire de leucocytes (5×10^6 cellules/ml) a été incubée avec une solution d'IgG humain (Sigma) à une concentration finale de $50 \mu\text{g/ml}$ pendant 15 minutes sur glace. Cette étape est favorable pour éviter les colorations non-spécifiques attribuables à la fixation des Ig par la portion Fc.

Plusieurs types d'anticorps ont été utilisés pour le phénotypage des leucocytes, des anticorps déjà conjugués à un fluorochrome et d'autres conjugués à une molécule de biotine. Pour marquer les cellules avec des anticorps déjà conjugués à un fluorochrome, il a suffi de prendre la suspension de cellules déjà en présence des IgG humains, d'y rajouter l'anticorps et de l'incuber à 4°C pendant 30 minutes. Ensuite, deux lavages ont été effectués avec une solution de HBSS + 0.1% de BSA. Les cellules ont été gardées sur glace jusqu'au moment de l'analyse au FACScan. Pour ce qui est du marquage avec les anticorps biotinilés, il a suffi de les ajouter à la suspension de cellules en présence des IgG, d'incuber 30 minutes, d'effectuer deux lavages et ensuite, d'ajouter de la streptavidine conjuguée, soit à de la R-PE soit à du FITC dépendant de la coloration voulue. Une deuxième incubation de 30 minutes a été nécessaire, suivie de deux autres lavages avant l'analyse finale.

Voici la liste des anticorps utilisés et de leur provenance : anti-CD14 couplé au FITC (Sigma), anti-CD19 couplé à la R-PE (Sigma), anti-CD11b couplé au FITC (Sigma), anti-CD8 couplé au FITC (Serotec), anti-CD16b couplé au FITC (Serotec), Streptavidine R-PE (Serotec), Streptavidine FITC (Serotec) et quatre anticorps fournis par le laboratoire du Dr Jacques Bernier, anti-CD3 couplé au FITC, anti-CD4 couplé au FITC, anti-CD3 biotinilé et anti-HLA-DR biotinilé.

3.9 Analyse de données

Les cellules ont été analysées avec un cytomètre en flux standard FACScan (Becton Dickinson). Pour chacune des mesures, 10 000 évènements ont été compilés. Pour chacun des tests effectués, il y a eu un échantillon témoin et pour exclure les débris cellulaires, une région a été dessinée pendant l'acquisition des leucocytes. La cueillette des données s'est faite avec le logiciel Lysis II (Becton Dickinson, Mountain View, CA) qui est spécialement adapté aux systèmes de cytométrie en flux. Les données ont ensuite été converties pour pouvoir être utilisées sur un ordinateur de type PC avec le logiciel Lifutil (Hewlett-Packard Co.). La sortie des données et leur analyse se sont faites à l'aide de WinMDI version 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA.), un logiciel spécialement conçu à cet effet.

3.10 Analyses statistiques

Pour chaque expérience effectuée, les résultats ont été compilés en deux groupes respectifs (acides aminés et glutamine) pour établir une moyenne. La compilation des données s'est faite grâce au logiciel Excel de Microsoft.

Pour les résultats des figures 2 à 14, les tests statistiques ont été effectués à l'aide d'un logiciel spécialisé se nommant Statistica de StatSoft. Puisque plusieurs facteurs hors de notre contrôle se sont produits au cours de l'étude, l'analyse statistique des données a été faite selon les règles de l'art pour de telles circonstances. Dans un premier temps, les résultats ont été transformés afin de s'assurer une distribution normale. Afin d'établir la

signification statistique, trois méthodes ont été utilisées, à savoir: la déletion des données incomplètes, la substitution des données manquantes par la moyenne de la réponse de tout les individus inclus dans l'étude et finalement, l'extrapolation des données manquantes. Puisque plusieurs facteurs influencent les mesures que nous avons effectuées, cette dernière méthode a été abandonnée. La signification statistique a été établie à partir des deux premières méthodes et a été considérée positive seulement si le test était significatif dans les deux circonstances. Des analyses de mesures répétées de type ANOVA ont été utilisées pour l'étude des significations statistiques. Des tests post-hoc ont été faits pour établir si la différence de réponse entre les deux groupes était responsable de la signification. Le seuil de signification a été établi à un $p \leq 0.05$ (Little et Dubin, 1987; <http://www.lcgeurope.com>).

Les résultats des tableaux V et IV ont été vérifiés avec de simples tests de T pour voir s'il y avait une différence significative entre les deux groupes de patients brûlés (comparaison de moyenne).

Chapitre 4

Résultats

4.1 Patients inclus dans l'étude

Parmi les patients admis, 18 se sont retrouvés aléatoirement dans le groupe recevant de la glutamine et 20, dans le groupe recevant un mélange d'acides aminés iso-azoté (Tableau V). Les tests étaient tous effectués dans la journée même du prélèvement sanguin, c'est-à-dire aux jours 4, 7, 14, 21 et 28 du protocole. Les patients qui sont décédés avant la fin du protocole (jour 28) ont été inclus dans l'étude et les patients qui ont été extubés (lorsque les plaies étaient bien cicatrisées) avant le jour 28 ont aussi été inclus dans l'étude (seulement avant l'extubation). Les 7 décès des patients ont eu lieu aux jours suivants: jour 3, 2 décès le jour 7, jour 9, jour 11, jour 13 et jour 26. Puisque le nombre de sujets était trop petit au jour 28, autant dans le groupe recevant de la glutamine que dans celui recevant le mélange d'acides aminés, les résultats de cette journée n'ont pas été inclus dans les analyses. Les figures qui vont suivre (2 à 14) sont des graphiques de type histogramme avec des barres d'erreur-type pour avoir une meilleure représentation visuelle des résultats obtenus. Le tableau VI démontre la répartition des patients parmi les deux groupes, autant au niveau de l'âge que de la surface brûlée ou greffée des patients.

Tableau V. Nombre de décès et d'extubations parmi les patients inclus dans l'étude

Groupe	Nombre de Patients	Nombre de décès	Nombre d'extubations	Jours de traitements
Patients a.a.	n = 20	n = 7	n = 7	n = 24 ± 9
Patient gln	n = 18	n = 0	n = 6	n = 30 ± 12

Tableau VI. Caractéristiques des patients inclus dans l'étude.

Groupe	Nombre de Patients	Âge	TBSA %	Blessure par inhalation	Surface greffée (cm ²)
Patients a.a.	n = 20	45 ± 9	39.05 ± 13.9	n = 9	5839 ± 4448
Patient gln	n = 18	39 ± 11	39.53 ± 18.9	n = 7	6809 ± 3403

4.2 Fonctions des phagocytes

Avec la technique de cytométrie de flux, quatre paramètres ont été évalués chez les cellules effectuant la phagocytose: la phagocytose elle-même, la flambée oxydative, le potentiel mitochondrial et la quantité de thiols présente dans les cellules. Voici la présentation des résultats obtenus avec les phagocytes.

4.2.1 Fonctions des neutrophiles

4.2.1.1 Phagocytose

Les résultats présentés à la figure 2 et à la figure 3 représentent respectivement le pourcentage de cellules effectuant la phagocytose et l'intensité de la phagocytose. L'intensité de la phagocytose représente l'efficacité des cellules à effectuer cette fonction, plus elles phagocytent un grand nombre de particules, plus l'intensité de la phagocytose sera élevée au niveau des résultats. À la figure 2, les résultats de l'activité phagocytaire montrent qu'il n'y a pas de différence significatives au niveau du pourcentage de cellules qui effectuent la phagocytose dans la population de neutrophiles (figure 2A). Lorsque l'intensité de la phagocytose est considéré, il a été noté que celle-ci est plus faible au niveau du groupe recevant de la glutamine (figure 3A, P = 0.05). Donc, l'administration de glutamine n'a pas d'effet sur le nombre de cellules qui phagocytent. Toutefois, une diminution du nombre de bactéries phagocytées par les neutrophiles a été notée.

4.2.1.2 Flambée oxydative

L'analyse des résultats de flambée oxydative nous permet de voir la capacité des cellules à tuer un microorganisme après avoir effectué l'ingestion de celui-ci, c'est-à-dire après l'avoir phagocyté. Le paramètre présenté à la figure 4 est la fluorescence moyenne des cellules en fonction du temps. Les résultats ne montrent aucun changement significatif de la flambée oxydative pour les neutrophiles (figure 4A). Pour les 21 jours suivant la brûlure, l'administration de glutamine n'a donc aucun effet sur ce paramètre.

4.2.1.3 Potentiel mitochondrial

Le potentiel mitochondrial représente l'état énergétique de la cellule. Pour ce qui est des résultats sur le potentiel mitochondrial des neutrophiles, la figure 5A démontre qu'il n'y a aucune différence entre les moyennes des deux groupes de patients brûlés. En effet, les tests statistiques révèlent qu'il n'y a pas d'effet groupe, mais par contre, il est possible d'observer un effet dans le temps au niveau des deux groupes de patients brûlés. La moyenne de l'intensité du potentiel mitochondrial des deux groupes est plus élevée au jour 4 diminue légèrement jusqu'au jour 21 ($P = 0.05$).

4.2.1.4 Thiols

La quantité de thiols de petit poids moléculaire est représentative du niveau de glutathion présent dans les cellules, ceci est en rapport avec le stress oxydatif que subissent les cellules. Le dosage des thiols, au niveau de la population de neutrophiles, est exposé à la figure 6A. Aucune différence significative n'a été obtenue entre le groupe glutamine et le groupe témoin (acides aminés). De plus, il n'y a pas d'effet temps significatif observable pour ces résultats.

4.2.2 Fonctions des macrophages

4.2.2.1 Phagocytose

Les résultats sur le pourcentage de monocytes/macrophages effectuant la phagocytose, présentés à la figure 2B, démontrent que la moyenne du groupe glutamine est plus élevée partout sauf au jour 4. Suite à l'analyse statistique de ces résultats, on n'observe aucune différence significative dans le temps ou entre les deux groupes de patients brûlés. Par contre, une différence significative est obtenue au niveau de l'intensité de la phagocytose des macrophages (figure 3B). Selon les analyses des tests statistiques, il y a un effet temps ($P = 0.001$) et également un effet groupe ($P = 0.026$) qui sont observables. C'est le groupe acides aminés qui possède l'intensité la plus élevée pour les trois premiers jours du protocole. Il est aussi possible de voir que la moyenne du groupe a.a., pour l'intensité de la phagocytose des monocytes, va en diminuant au jour 21 tandis que la moyenne du groupe glutamine se maintient tout au long du protocole.

4.2.2.2 Flambée oxydative

En observant les résultats obtenus à la figure 4B, il est difficile de détecter des différences au niveau de l'intensité de la flambée oxydative des monocytes, entre les deux groupes de patients brûlés. Les tests statistiques ne démontrent pas de différences significatives entre les groupes mais confirment un effet temps au niveau des deux groupes ($P = 0.007$). En effet, l'intensité de la flambée oxydative des monocytes tend à diminuer au fil des jours.

4.2.2.3 Potentiel mitochondrial

À la figure 5B, les résultats exposés portent sur l'intensité du potentiel mitochondrial des monocytes/macrophages de la circulation sanguine. Ce paramètre est directement représentatif de l'état énergétique des cellules. Le groupe de patients ayant reçu de la glutamine affiche un potentiel mitochondrial un peu plus faible aux jours 14 et

21 du protocole, les moyennes des jours 4 et 7 étant à peu près équivalentes entre les deux groupes. Même si la différence est plus prononcée au jour 21, les tests statistiques révèlent qu'il n'y a aucune différence significative entre les deux groupes de patients brûlés.

4.2.2.4 Thiols

Les résultats d'évaluation de la quantité de thiols dans la population de monocytes/macrophages sanguins se retrouvent à la figure 6B. Les thiols ont été dosés pour évaluer la quantité de glutathion présente dans les cellules (voir chapitre 3.7). Il n'y a aucune différence significative observée entre le groupe des patients brûlés recevant de glutamine et celui recevant des acides aminés. Les tests statistiques ne révèlent aucun effet dans le temps qui soit significatif pour le dosage des thiols.

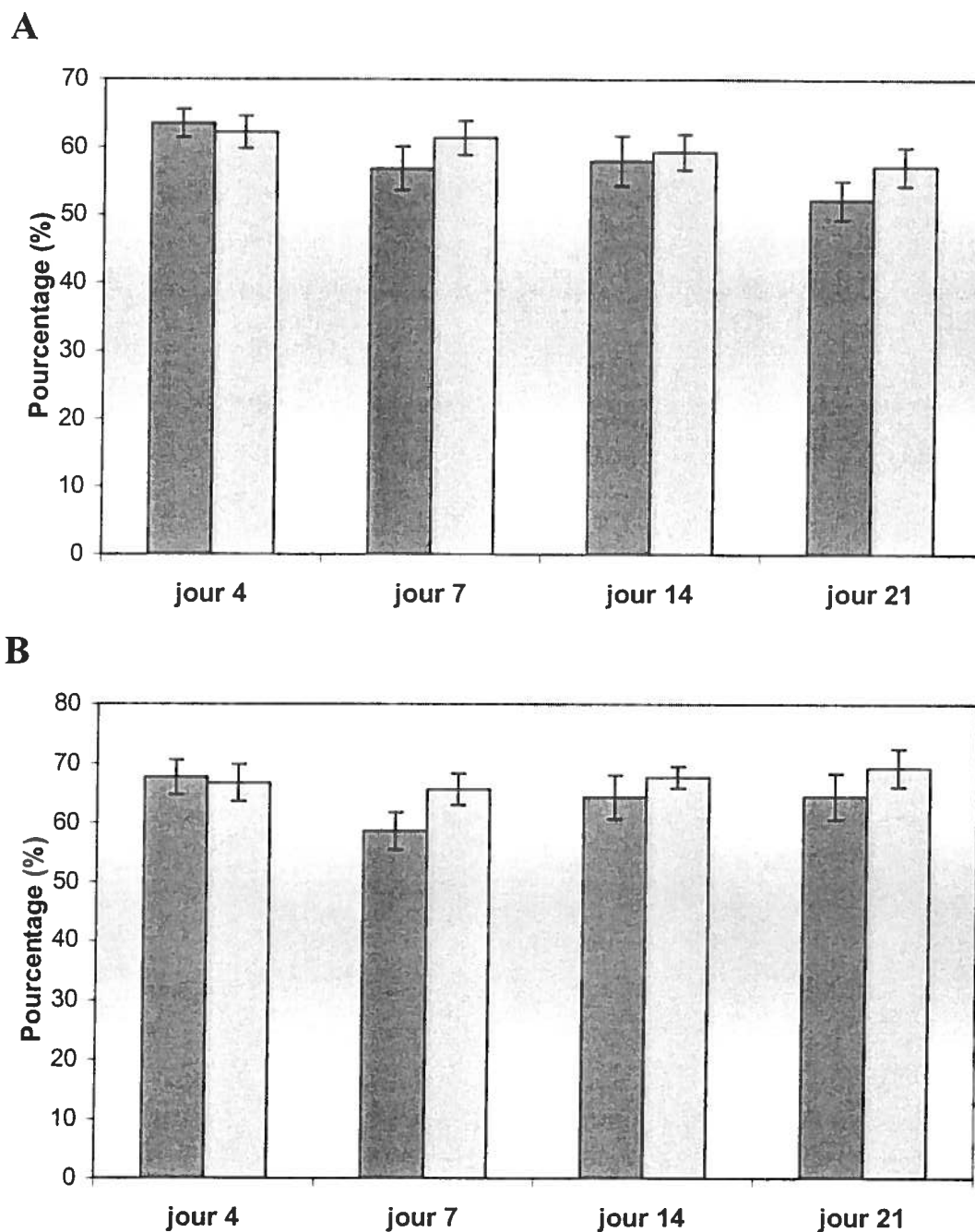


Figure 2. Résultats de phagocytose obtenus avec les leucocytes du sang des patients brûlés (■ Patients a.a., □ Patients gln), aux différents jours du protocole. (A) Pourcentage de granulocytes ayant effectué de la phagocytose. (B) Pourcentage de monocytes ayant effectué de la phagocytose. Ces résultats ont été obtenus par des analyses de cytométrie en flux après 30 minutes d'incubation des cellules en présence de bactéries *staphylococcus aureus* marquées avec un fluorochrome et ayant été préalablement opsonisées avec des composantes du sérum humain.

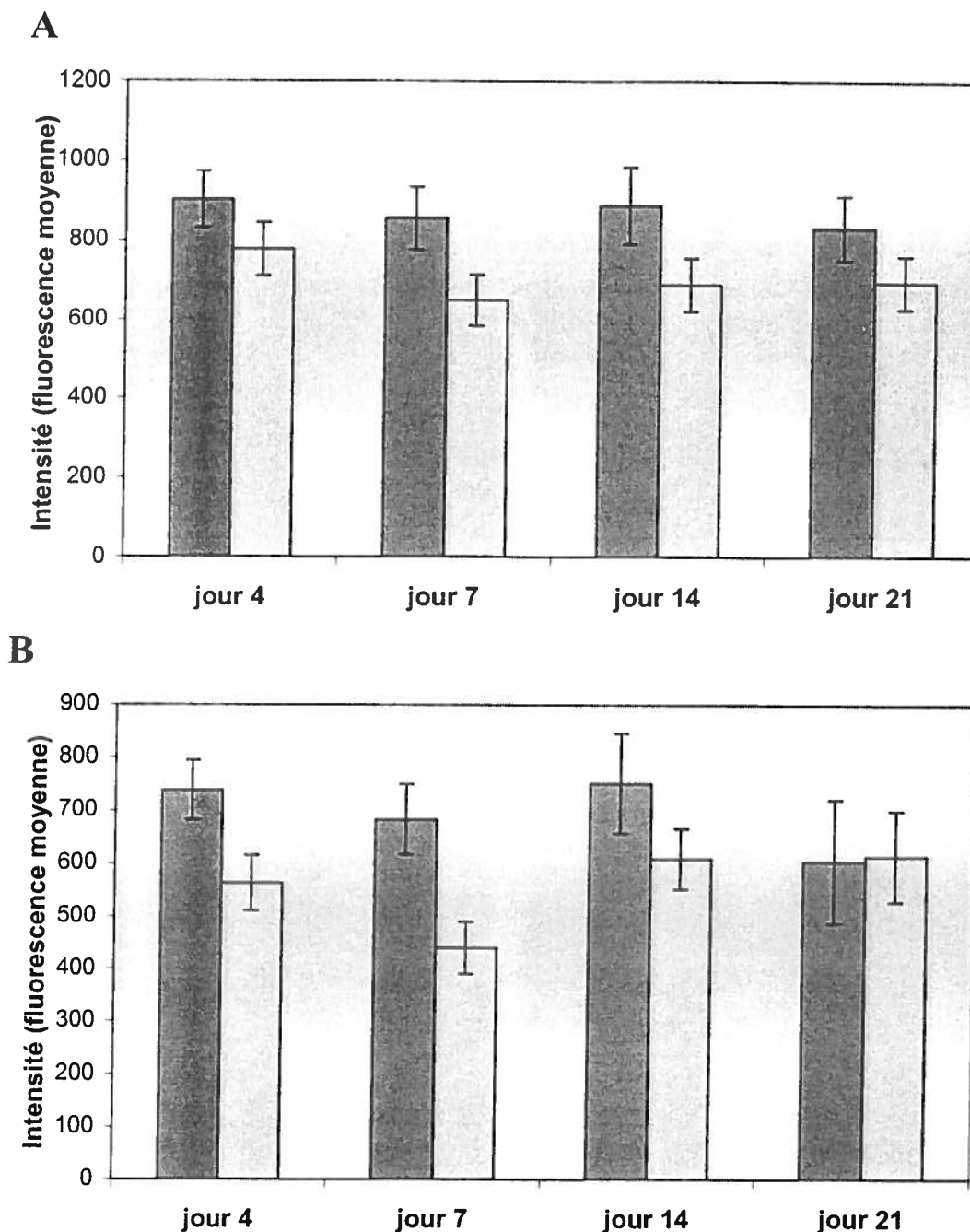
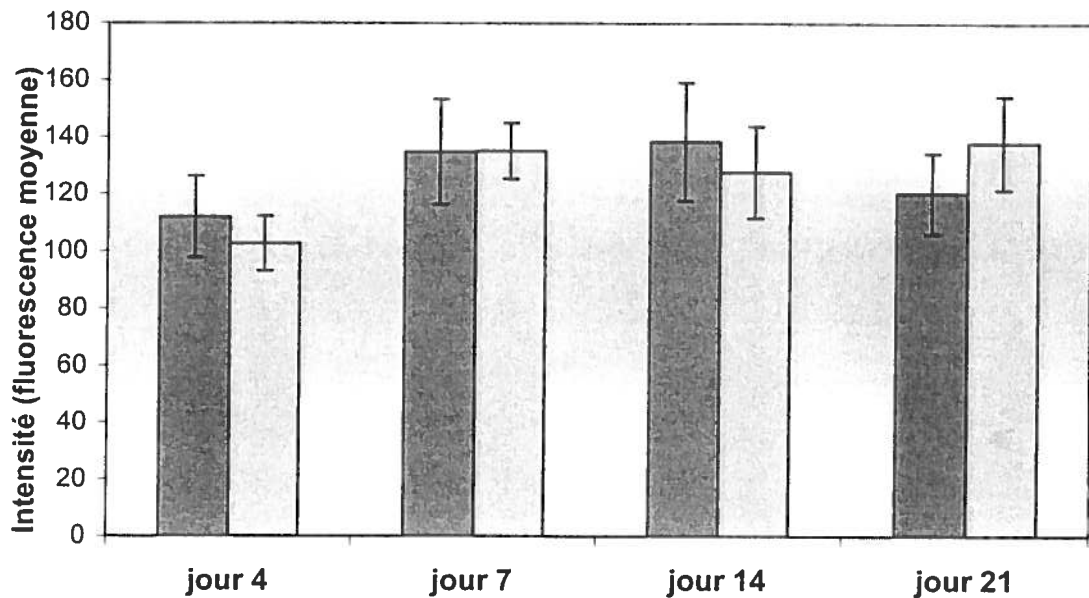


Figure 3. Intensité de la phagocytose qui a été effectuée par des populations de cellules provenant du sang des patients brûlés (■ Patients a.a., □ Patients gln) aux différents jours du protocole. (A) Population de granulocytes. Différence significative entre les deux groupes de patients ($P = 0.050$). (B) Population de monocytes où l'on observe une différence entre les deux groupes ($P = 0.026$). La différence entre les deux groupes de patients est due à l'écart aux jours 4 ($P = 0.05$) et 7 ($P = 0.001$). L'intensité de la phagocytose est déterminée selon la fluorescence moyenne qu'expriment les cellules et celle-ci est détectée par la méthode de cytométrie de flux.

A



B

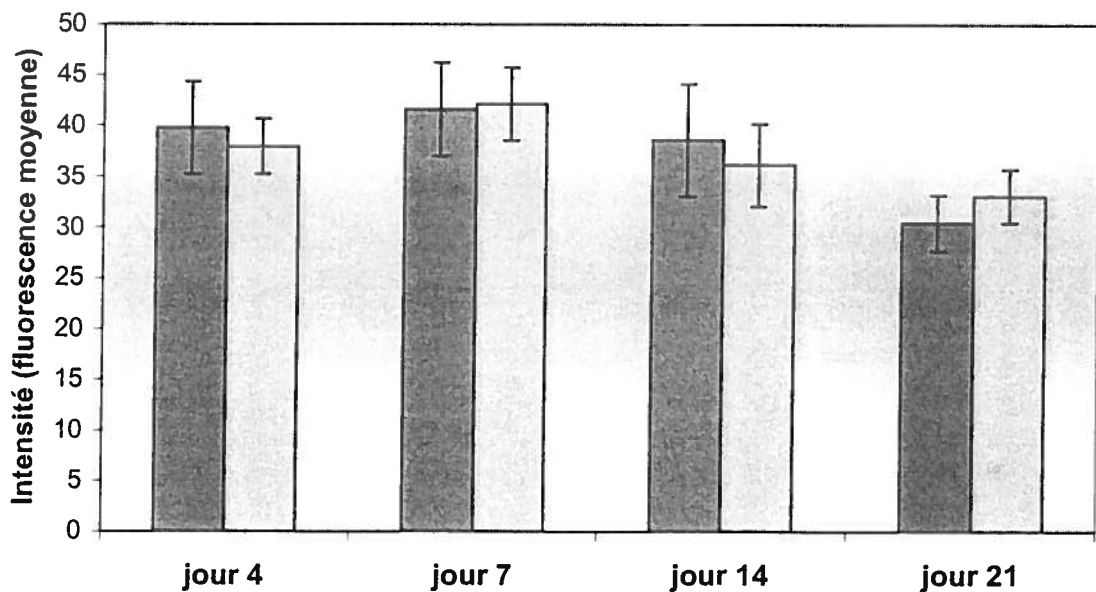


Figure 4. Comparaison de l'intensité de la flambée oxydative entre les deux groupes de patients brûlés (■ Patients a.a., □ Patients gln). (A) Population de granulocytes. (B) Population de monocytes. Une baisse significative ($P = 0.007$) de l'intensité est observée parmi les deux groupes de patients brûlés dans le temps pour les monocytes. Les cellules ont été préalablement incubées avec une sonde (DCFDA) qui devient fluorescente suite à une réaction avec du H_2O_2 produit par les cellules lors de la flambée oxydative qui a été induite avec du PMA. La fluorescence produite par les cellules a été mesurée grâce à la méthode de cytométrie de flux.

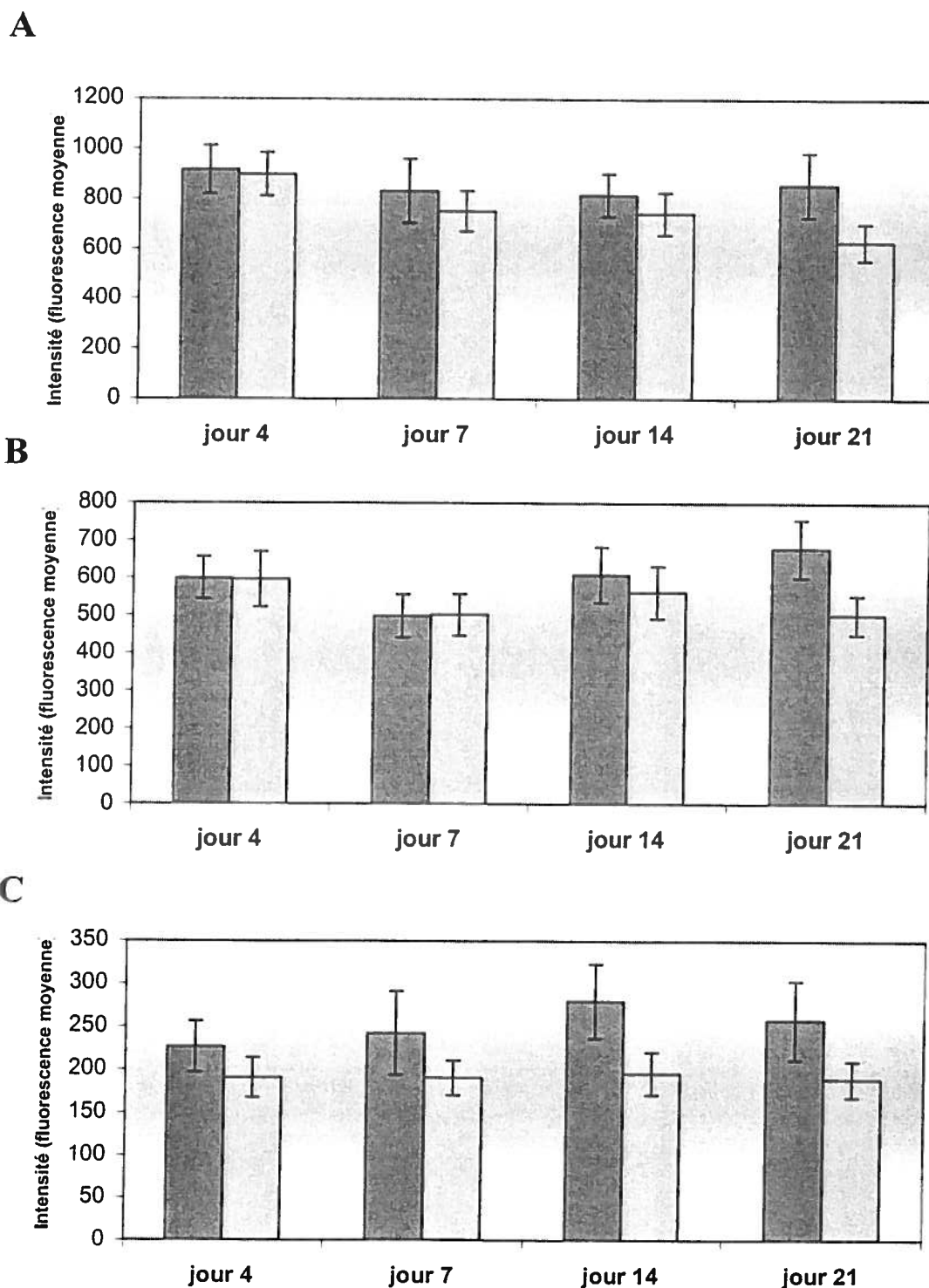
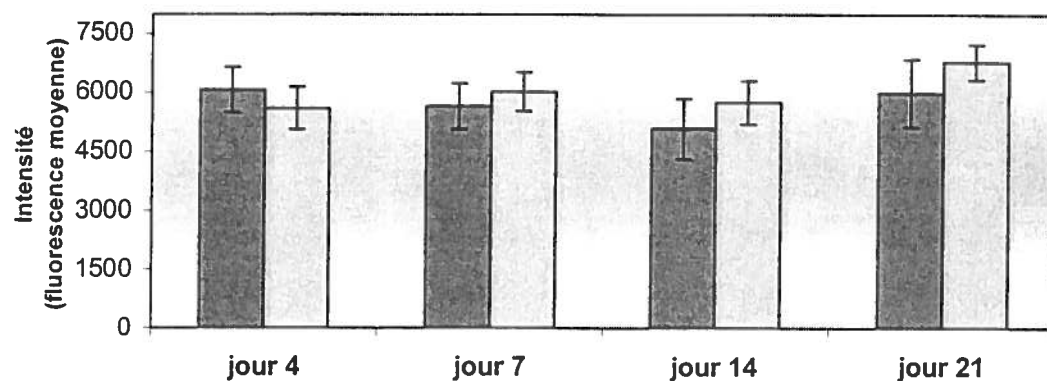
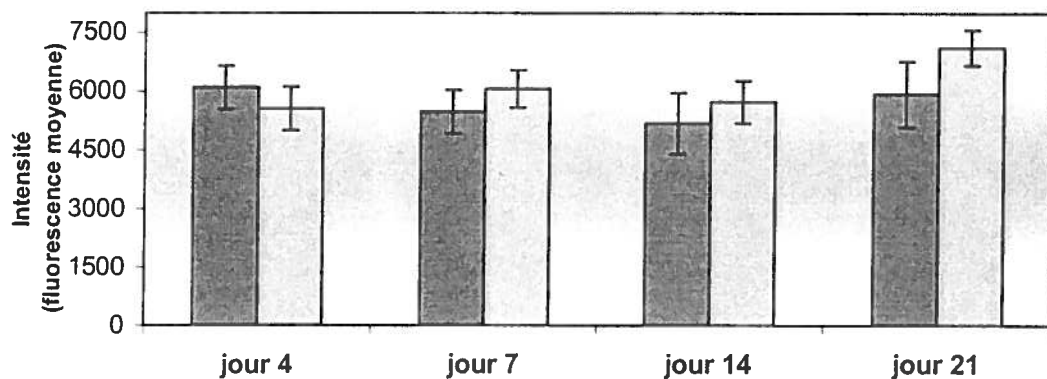


Figure 5. Évaluation du potentiel mitochondrial des différentes populations de leucocytes (A) Granulocytes, (B) Monocytes, (C) Lymphocytes, parmi les deux groupes de patients brûlés (■ Patients a.a., □ Patients gln). On peut remarquer un effet significatif ($P = 0.05$) dans le temps pour la population de granulocytes. Les cellules ont été incubées avec de la Rhodamine 123 et ensuite, analysées par cytométrie en flux.

A



B



C

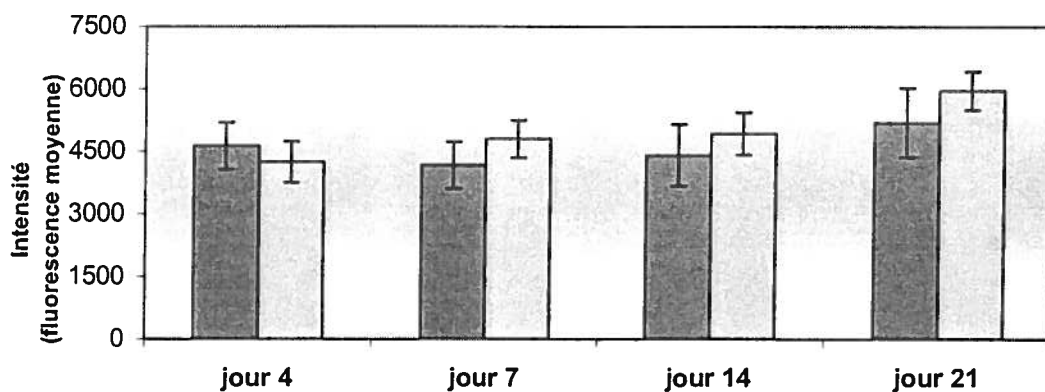


Figure 6. Dosage des molécules de petit poids moléculaire contenant des thiols chez les différentes populations de leucocytes (A) Granulocytes, (B) Monocytes, (C) Lymphocytes, parmi les deux groupes de patients brûlés (■ Patients a.a., □ Patients gln). La mesure des thiols consiste à représenter la quantité de glutathion présente dans les cellules. Les cellules sont préalablement incubées à 37°C pour 10 minutes avec une sonde (CMFDA) qui devient fluorescente au contact des thiols de petits poids moléculaire. La fluorescence des cellules est ensuite mesurée en cytométrie de flux.

4.3 Analyse des populations de leucocytes

Les populations de leucocytes peuvent être observées selon l'expression de plusieurs molécules de surface cellulaire. Le statut du système immunitaire peut être reflété par les sous-populations de leucocytes dans le sang. Les fluctuations dans le nombre de cellules sont le reflet de l'état du système immunitaire.

4.3.1 Les neutrophiles/CD16b

Puisque le CD16b est exprimé sur les neutrophiles, le marquage des cellules avec un anti-CD16b nous donne une bonne approximation de la population de neutrophiles présents dans le sang des patients. Les résultats du phénotypage avec le CD16b peuvent être observés à la figure 7. Le groupe recevant la glutamine démontre une diminution significative au jour 7 par rapport au groupe témoin ou a.a. ($P = 0.03$). Les tests statistiques révèlent qu'à cause de la différence marquée au jour 7, l'effet groupe est significatif à $P = 0.05$. Donc au jour 7, les patients faisant partie du groupe glutamine ont moins de neutrophiles dans leur sang périphérique que les patients témoin. Les statistiques démontrent aussi qu'il y a un effet dans le temps qui est significatif ($P = 0.001$): le nombre de neutrophiles semble être beaucoup plus bas au jour 4 qu'aux autres jours du protocoles.

4.3.2 Les macrophages/CD14

Le récepteur CD14 est une glycoprotéine hautement exprimée à la surface des monocytes/macrophage. Le CD14 est reconnu comme un très bon marqueur de différenciation pour les monocytes ou macrophages (Hetherington *et al.*, 1999; Simmons *et al.*, 1989).

L'analyse des résultats présentés à la figure 8 démontrent qu'il n'y a pas de différence significative entre le groupe glutamine et le groupe acides aminés au niveau de la quantité de monocytes/macrophages présents dans le sang périphérique des patients.

Cependant, il est possible de constater qu'il y a une augmentation significative ($P = 0.003$) du nombre de monocytes ou macrophages tout au long des jours du protocole pour les deux groupes.

4.3.3 Les lymphocytes

4.3.3.1 Potentiel mitochondrial

Les résultats de l'évaluation du potentiel mitochondrial de la population de lymphocytes sont représentatifs de l'état énergétique de ces cellules. Ils sont exposés à la figure 5C. L'analyse de ces résultats démontre que l'état énergétique des lymphocytes provenant du groupe de patient glutamine n'est pas différent de celui des patients recevant le mélange d'acides aminés. De plus, il est possible de voir que l'état énergétique des lymphocytes, parmi les deux groupes de patients brûlés, ne change pas de façon significative entre le jour 4 et le jour 21 du protocole.

4.3.3.2 Thiols

À la figure 6C sont exposés les résultats de l'évaluation de la quantité de thiols présents dans les cellules faisant partie de la population de lymphocytes sanguins. Les thiols sont évidemment représentatifs de la quantité de glutathion présent dans les cellules. Les lymphocytes provenant du groupe glutamine semblent avoir une quantité plus élevée de glutathion que ceux du groupe témoin, sauf au jour 4, cependant les tests statistiques démontrent qu'il n'y a aucune différence significative ni au niveau des groupes ni dans le temps.

4.3.3.3 Les lymphocytes B/CD19

Le CD19 est une protéine qui est membre de la superfamille des Ig contenant un domaine cytoplasmique d'environ 240 acides aminés. Il est spécifique aux cellules B et exprimé par les pré-cellules B à partir du moment des réarrangements des chaînes lourdes jusqu'à la différenciation des cellules plasmiques (Sato *et al.*, 1997). Le CD19 a été

choisi comme marqueur de différenciation des lymphocyte B, pour analyser les populations présentes chez les deux groupes de patients brûlés (figure 9). Les analyses statistiques prouvent qu'il y a une différence entre les deux groupes de patients ($P = 0.042$) et celle-ci est due plus particulièrement à la différence marquée du jour 7 ($P = 0.026$), où le groupe glutamine est beaucoup plus élevé. L'allure du graphique démontre que le temps a aussi un effet ($P = 0.019$) sur la quantité de lymphocyte B présents chez les patients brûlés. En effet, il est possible de voir une augmentation marquée aux jours 7 et 14 et celle-ci est suivie d'une diminution au jour 21.

4.3.3.4 Les lymphocytes T/CD3

Le CD3 est une molécule de surface cellulaire associé au récepteur de l'antigène au niveau de la population de lymphocytes T. Le pourcentage de lymphocytes T a été évalué parmi la population totale de leucocytes (figure 10A) et parmi la population de lymphocytes (figure 10B). La différence entre les résultats des figures 10A et 10B est la suivante: le nombre de cellules de la figure 10A a été déterminé à partir d'un pourcentage de cellules exprimant le CD3 parmi la population totale de leucocytes, tandis que la figure 10B a été déterminée à partir d'un pourcentage de cellule exprimant le CD3 parmi la population de lymphocytes. Au jour 4, le pourcentage de lymphocytes T présent dans le sang périphérique représente environ le tiers de la quantité normalement retrouvée chez des sujets sains (données non-présentées).

En ce qui concerne la figure 10A, les statistiques démontrent qu'il n'y a aucun effet significatif de groupe. Par contre, ceux-ci prouvent qu'il y a un effet temps assez important ($P = 0.0001$). Il est possible de remarquer une augmentation progressive du jour 4 jusqu'au jour 14.

Pour la figure 10B, le profil des différences entre les deux groupes de patients brûlés ressemble à celui de la figure 10A. Cependant, les résultats obtenus et exposés sur ce graphique sont probablement plus précis que ceux de la figure 10A, car l'évaluation du nombre de cellules portant le CD3 s'est faite parmi la population des lymphocyte, en dessinant un région autour de la population de cellules avec le logiciel d'analyse de

cytométrie (Winmdi). Contrairement à la figure 10A, la quantité de lymphocytes est significativement différente ($P = 0.006$) entre les deux groupes de patients brûlés, plus particulièrement au jour 7 ($P = 0.03$). Le groupe recevant la glutamine possède un plus grande nombre de lymphocytes T. Il est possible également de constater un effet temps ($P = 0.001$) semblable à la figure 10A.

4.3.3.5 Les sous-populations de lymphocytes/CD4 et CD8

Le CD4 est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la superfamille de gènes des Ig. Cette molécule caractérise les lymphocytes T collaborateurs ou auxiliaires. Une double coloration reconnaissant les récepteurs CD3 et CD4 a été utilisée pour dénombrer le pourcentage de la population de lymphocytes T collaborateurs présents parmi la population de lymphocytes (figure 11). Lors de la compilation des résultats, une région est délimitée autour de la population de lymphocytes pour l'isoler et analyser les différentes sous-populations de ce groupe de cellules. Le nombre de lymphocytes T collaborateurs du groupe gln est plus élevé que celui du groupe a.a. ($P = 0.01$). La différence est vraiment marquée au jour 7 du protocole. De plus les analyses statistiques démontrent qu'il y a aussi un effet dans le temps qui est significatif ($P = 0.001$), il y a une augmentation du nombre de cellules entre les jours 4 et 7.

La molécule CD8 est aussi une glycoprotéine de surface cellulaire, faisant partie de la superfamille de gènes des Ig. Elle est exprimée presque qu'exclusivement sur les lymphocytes T matures et elle est spécifique aux produits du CMH de classe I. La présence de cette molécule est caractéristique des lymphocytes T cytotoxiques ou suppresseurs. Le CD8 a été utilisé comme marqueur de différenciation des lymphocytes T cytotoxiques en coloration double avec le CD3 (figure 12). Le pourcentage de lymphocytes T cytotoxiques, parmi la population de lymphocytes du sang périphérique, a été évalué de la même façon que les lymphocytes T collaborateurs (CD3/CD4). Il est intéressant de voir que le groupe gln présente un nombre de cellules significativement plus haut ($P = 0.05$) que le groupe a.a. aux jours 4, 7 et 14. L'effet global de la glutamine sur cette population de cellule est significatif ($P = 0.006$). Pour ces résultats, il est

également possible de constater qu'il y a un effet temps ($P = 0.001$) exercé sur cette population de lymphocytes T cytotoxiques

4.3.4 Expression des marqueurs d'activation

4.3.4.1 Expression du CD11b

Le CD11b fait partie de la famille des β_2 -intégrines et est toujours associé à une sous-unité β appelée CD18. Le CD11b-CD18 est aussi connu sous le nom de Mac-1 ou CR3. Le CD11b est considéré comme un marqueur d'activation, pour cette raison, sa présence a été analysée. La figure 13 représente le nombre de cellules exprimant le CD11b retrouvés sur les leucocytes totaux du sang périphérique des groupes de patients brûlés. Partout sauf au jour 4, c'est le groupe de patient a.a. qui possède le plus grands nombre de cellules ayant le marqueur d'activation CD11b. Les tests statistiques révèlent qu'il y a un effet groupe significatif ($P = 0.05$), qui est plus marqué au jour 3 ($P = 0.03$), et également un effet temps ($P = 0.001$) sur les cellules des patients brûlés. La quantité de cellules est moins grande au jour 4.

4.3.4.2 Expression des antigènes de classe II du CMH/HLA-DR

Le récepteur membranaire HLA-DR est une molécule du CMH de classe II. Les molécules HLA de classe II sont exprimées principalement à la membrane de cellules immunitaires présentatrices de l'antigène (APC) comme les lymphocytes B et les cellules professionnelles présentatrices telles que les macrophages, les cellules dendritiques interstitielles et les cellules de Langerhans de la peau (Colombani, 1993). Elles sont également présentes à la surface des lymphocytes T activés. Pour les lymphocytes B et T, l'expression du HLA II dépend respectivement de leur état de différenciation et de leur état d'activation. En effet, seules les cellules B matures expriment les molécules de HLA II à la différence des cellules immatures et des plasmocytes, alors que les lymphocytes T doivent être activés pour exprimer ces molécules à leur surface.

La figure 14 démontre le nombre de cellules exprimant le HLA-DR retrouvé parmi la population totale de leucocytes sanguins (figure 14A). Pour le nombre de cellules exprimant ce marqueur, il n'y a aucune différence significative entre les deux groupes de patients brûlés. Par contre il est possible d'observer des variations significatives ($p = 0.022$) du nombre de cellules portant ce marqueur entre les différents jours du protocole.

À la figure 14B, c'est le nombre de cellules exprimant le HLA-DR parmi la population de lymphocytes qui est représenté, ce qui permet d'identifier la population de cellules T activées. Cette analyse est faite grâce à un marquage double CD3/HLA-DR permettant de reconnaître cette population bien précise. Sur cette figure, il n'y a aucune différence significative entre les deux groupes de patients brûlés. Par contre, les statistiques démontrent un effet de temps significatif ($P = 0.019$).

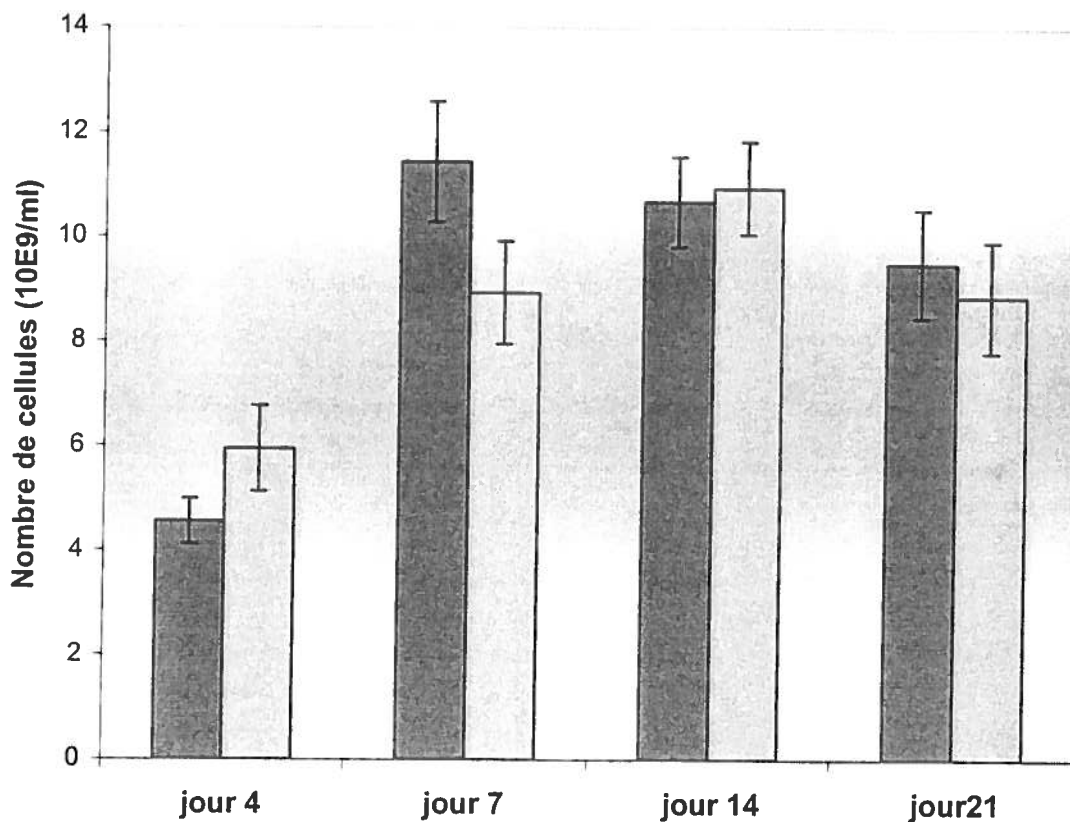


Figure 7. Quantité de cellules exprimant le CD16b parmi la population totale des leucocytes des patients brûlés (■ Patients a.a., □ Patients gln). Le CD16b est une molécule caractéristique que l'on retrouve à la surface de la membrane cellulaire des neutrophiles. Ces pourcentages sont donc représentatifs de la quantité approximative de neutrophiles présents dans le sang périphérique parmi globules blancs totaux. On observe une différence significative ($P = 0.05$) entre les deux groupes, surtout du au jour 7 du protocole ($P = 0.03$). Les statistiques révèlent aussi un effet temps sur le nombre de cellules ($P = 0.001$). Ces récepteurs sont détectés à l'aide de molécules (anti-CD16b) marquées avec des fluorochromes qui sont ensuite détectés par cytométrie de flux.

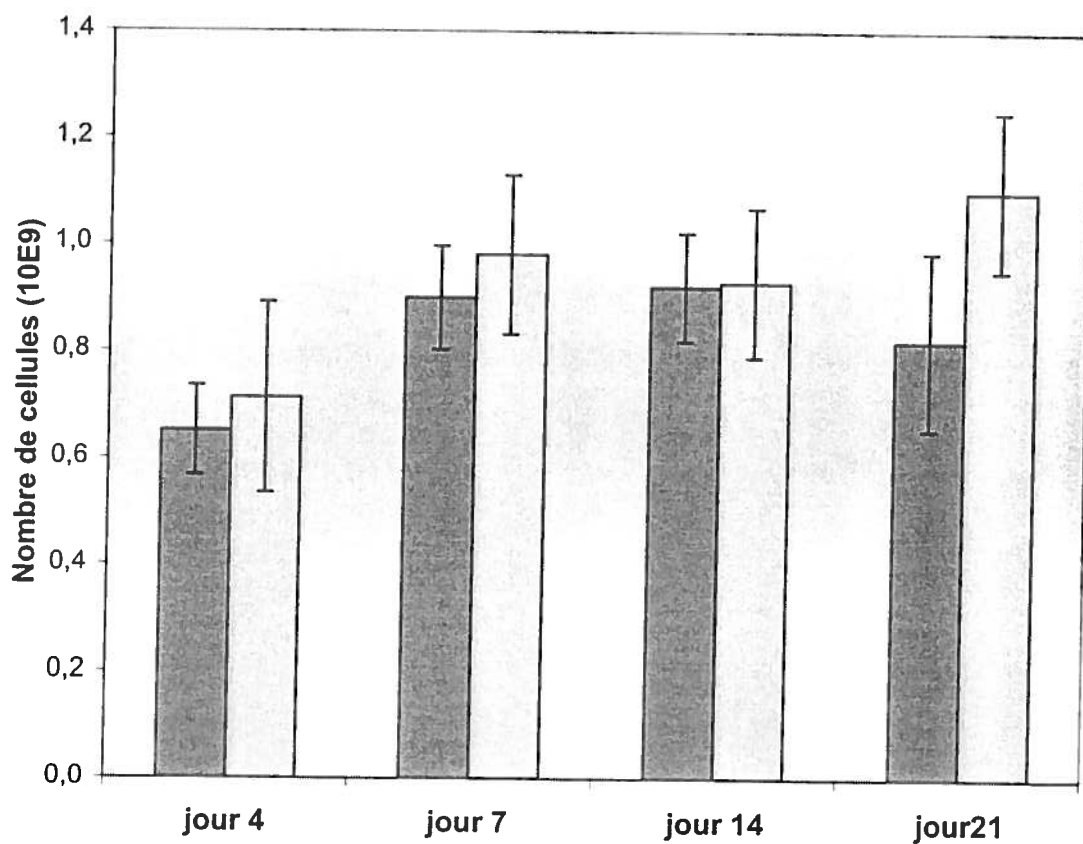


Figure 8. Quantité de cellules exprimant le CD14 parmi la population totale de leucocytes des patients brûlés (■ Patients a.a., □ Patients gln.). Les monocytes et les macrophages possèdent cette molécule sur leur surface membranaire. Ces pourcentages sont donc représentatifs de la quantité approximative de monocytes circulants dans le sang périphérique parmi globules blancs totaux. Les tests statistiques démontrent un effet temps significatif ($P = 0.003$). Ces récepteurs sont détectés à l'aide de molécules (anti-CD14) marquées avec des fluorochromes qui sont, par la suite, détectés par la méthode de cytométrie de flux.

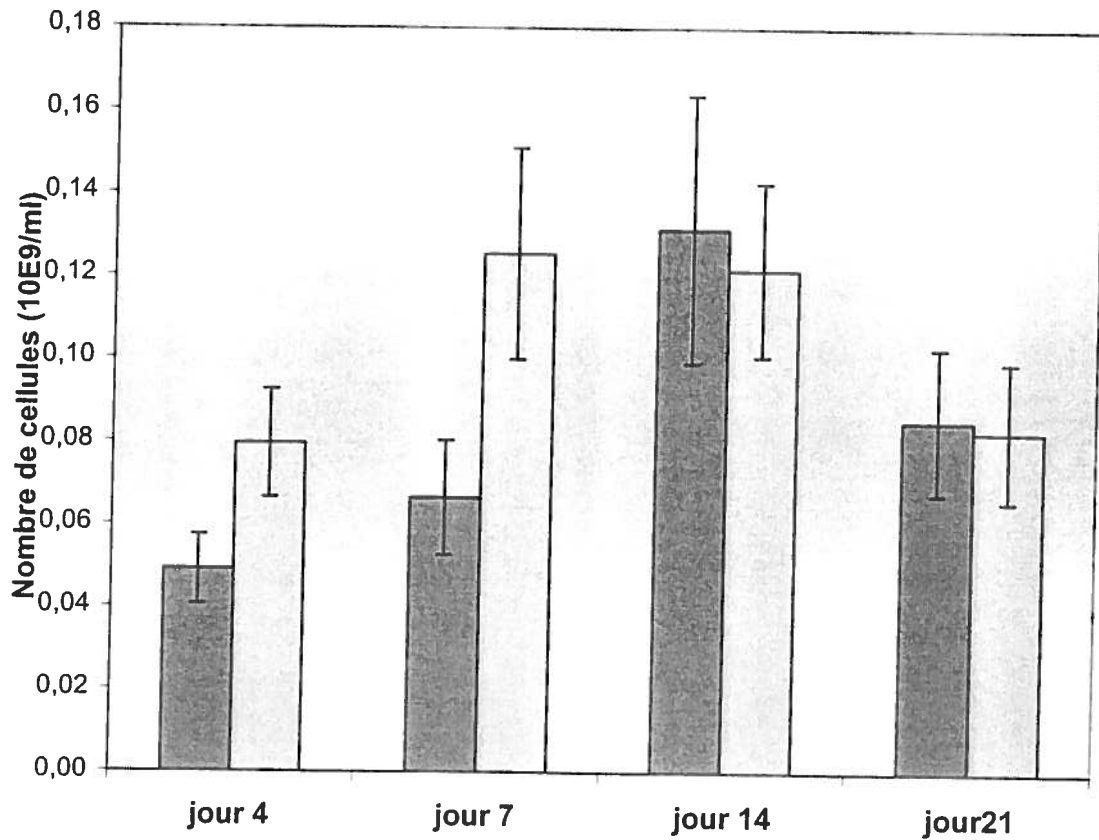


Figure 9. Quantité de cellules exprimant le CD19 parmi la population de lymphocytes des patients brûlés (■ Patients a.a., □ Patients gln). Le récepteur CD19 est retrouvé à la surface de la membrane cellulaire de tous les lymphocytes B. Il y a une différence marquée ($P = 0.026$) entre les deux groupes de patients brûlés au jour 7 du protocole. L'effet global de la glutamine sur le nombre de lymphocyte B est significatif ($P = 0.042$). Il y a aussi un effet temporel sur le nombre de cellules ($P = 0.019$). Ces récepteurs sont détectés à l'aide de molécules (anti-CD19) marquées avec des fluorochromes qui sont, par la suite, détectés par la méthode de cytométrie de flux.

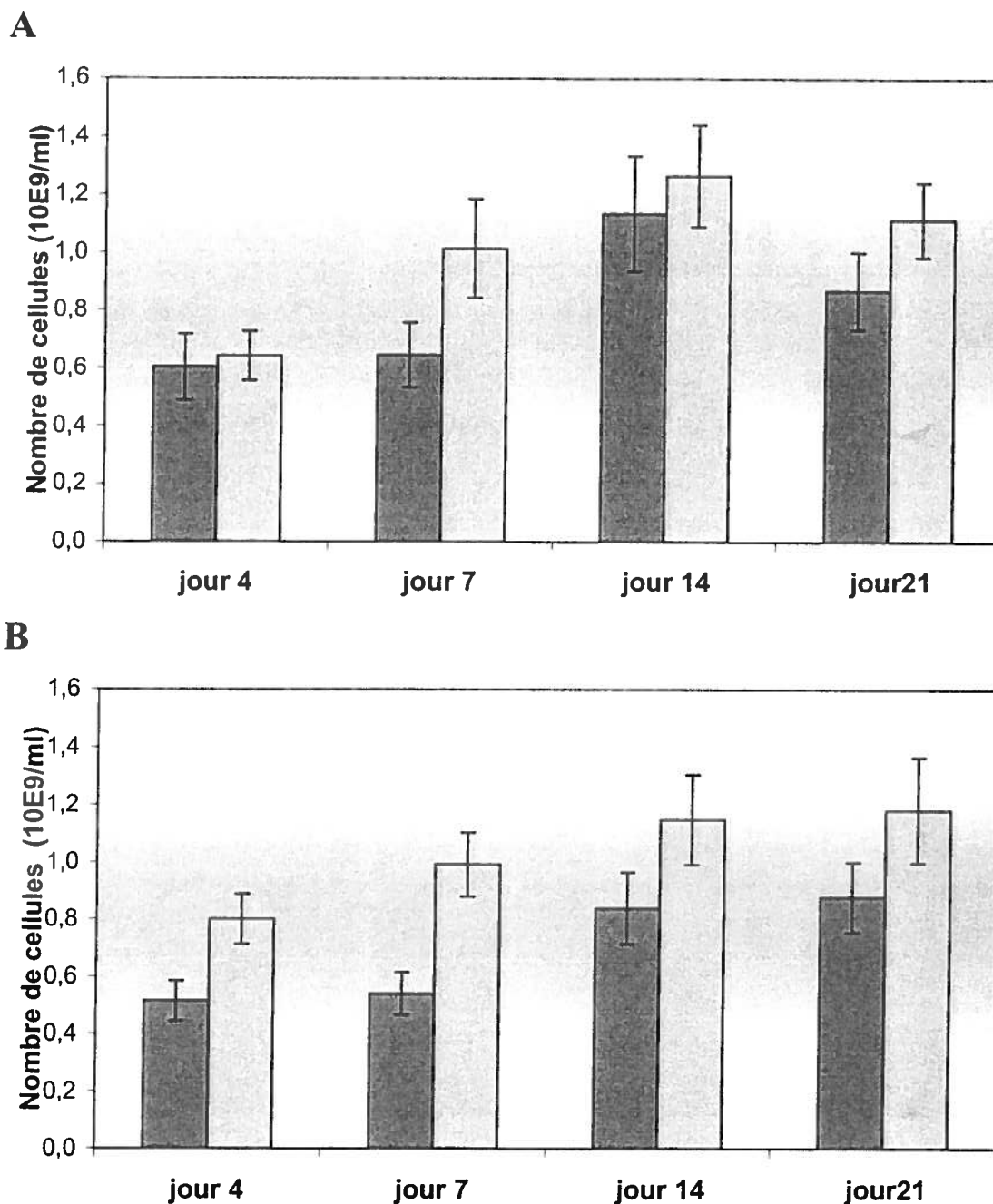


Figure 10. Quantité de cellules exprimant le CD3 (A) parmi la population totale des leucocytes, (B) parmi la population de lymphocytes des deux groupes de patients brûlés (■ Patients a.a., □ Patients gln). Le CD3 est un récepteur membranaire qui est retrouvé chez tous les lymphocytes T. Sur la figure 10A, il y a une augmentation significative du nombre de cellules dans le temps ($P = 0.0001$). Pour la figure 10B, on observe une différence entre les deux groupes au jour 7 du protocole ($P = 0.03$), un effet global de la glutamine qui est significatif ($P = 0.006$) et un effet temporel également significatif ($P = 0.001$). Les récepteurs sont détectés à l'aide d'anti-CD3 marqués avec des fluorochromes qui sont, par la suite, détectés par la méthode de cytométrie de flux.

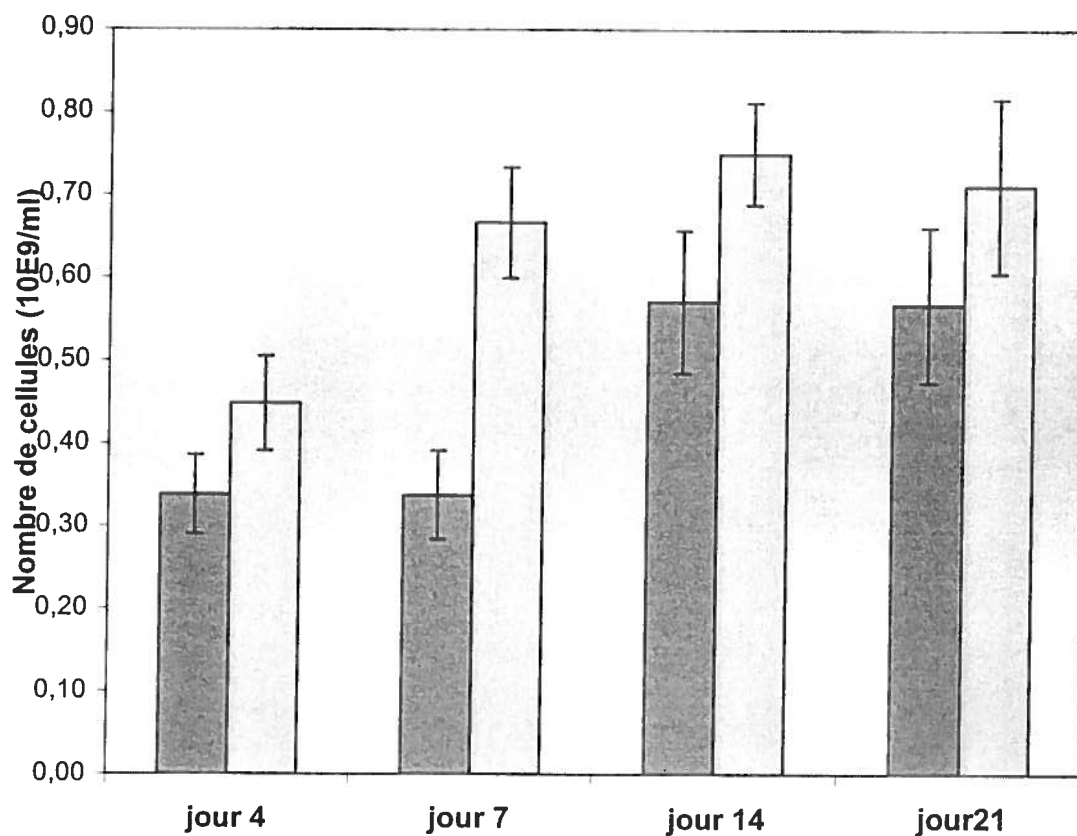


Figure 11. Quantité de cellules exprimant simultanément le CD3 et CD4 parmi la population de lymphocytes des groupes de patients brûlés (■ Patients a.a., □ Patients gln, ■ Patients ctrl). La double coloration par des molécules anti-CD3 et anti-CD4 marqués avec des fluorochromes émettant différentes longueurs d'onde, permet la reconnaissance d'une population spécifique de lymphocytes T auxiliaires. Une différence significative est observée entre les deux groupes de patients brûlés ($P = 0.01$). Les tests statistiques démontrent également des variations significatives entre les différents jours du protocole ($P = 0.001$) Les différents fluorochromes sont détectés avec la méthode de cytométrie de flux.

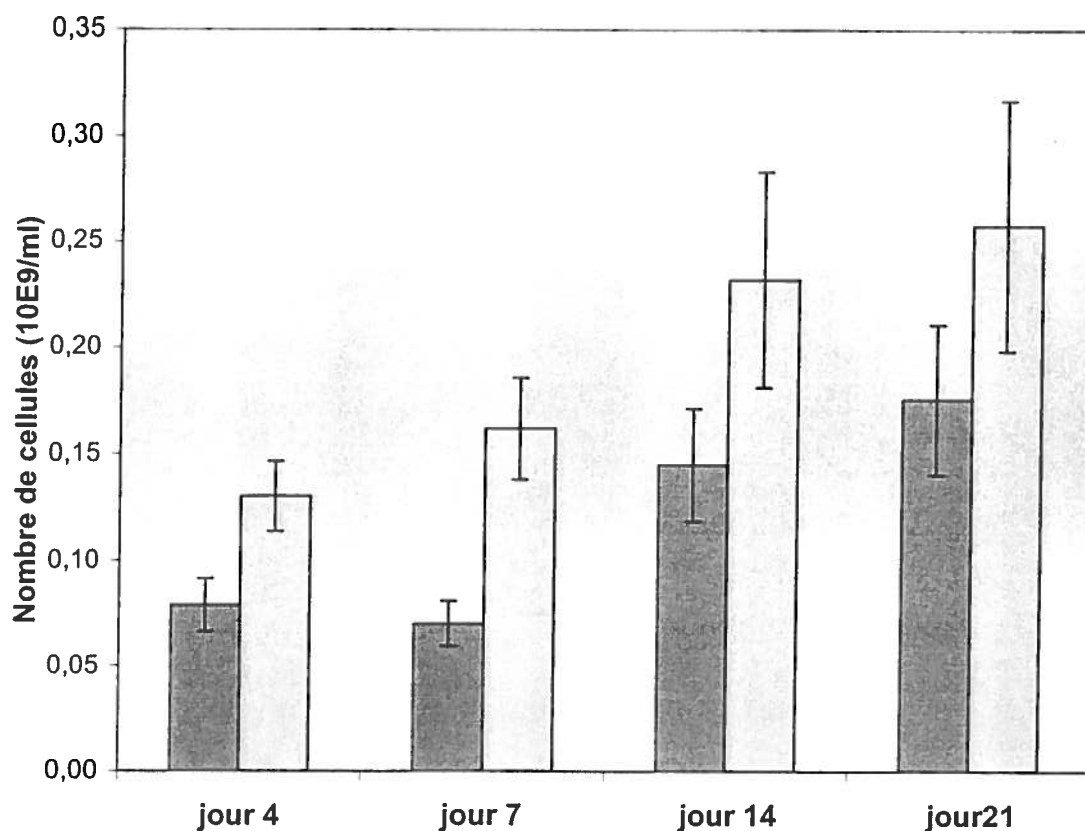


Figure 12. Quantité de cellules exprimant simultanément le CD3 et CD8 parmi la population de lymphocytes des groupes de patients brûlés (■ Patients a.a., Patients gln, ■ Patients ctrl). Le double marquage avec un anti-CD3 et un anti-CD8 permet de reconnaître une population de lymphocytes T cytotoxiques. Une différence est observée entre les deux groupes aux jours 4, 7 et 14 du protocole ($P=0.05$). L'effet global de la glutamine observé ici est significatif ($P = 0.006$). Il y a aussi un effet temporel, c'est-à-dire une augmentation significative ($P = 0.001$) du nombre de cellules entre les jour 4 et 21 du protocole. La détection des marqueurs est faite par cytométrie de flux.

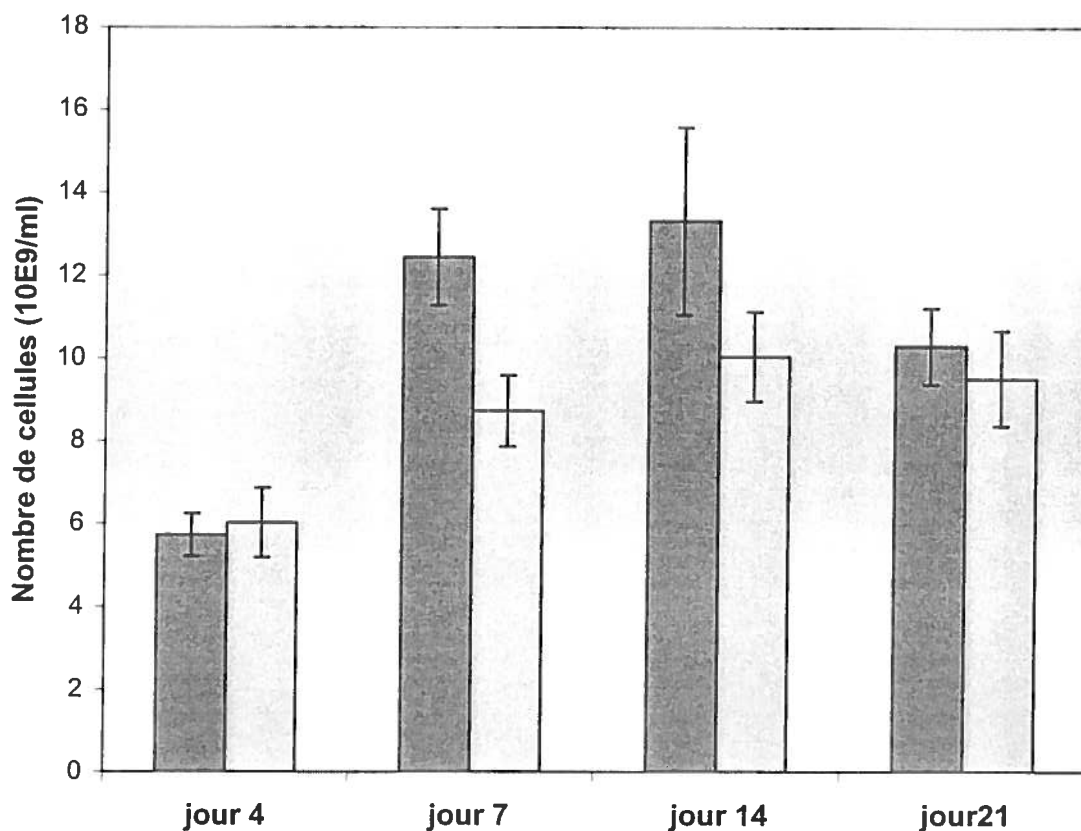


Figure 13. Quantité de cellules exprimant le CD11b parmi la population totale des leucocytes du sang périphérique des patients brûlés (■ Patients a.a., □ Patients gln.). Le récepteur CD11b connu aussi sous le nom de MAC-1 ou CR3 fait partie d'un complexe composé des trois hétérodimères avec une sous-unité β (CD18) commune liée de façon non-covalente au trois sous-unités α . Le CD11b est l'une de ces sous-unités α et les deux autres sont CD11a (aussi connue sous le nom de LFA-1) et CD11c (aussi connue sous le nom de CR4). Ces récepteurs contribuent à des fonctions de chimiotactisme, d'adhésion à l'endothélium, de phagocytose et de cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante (Shalekoff *et al.*, 1998). Le groupe a.a. est vraiment plus élevé que le groupe gln. au jour 7 ($P = 0.03$). L'effet global du traitement est significatif ($P = 0.05$) et il est aussi possible d'observer un effet temporel significatif ($P = 0.001$).

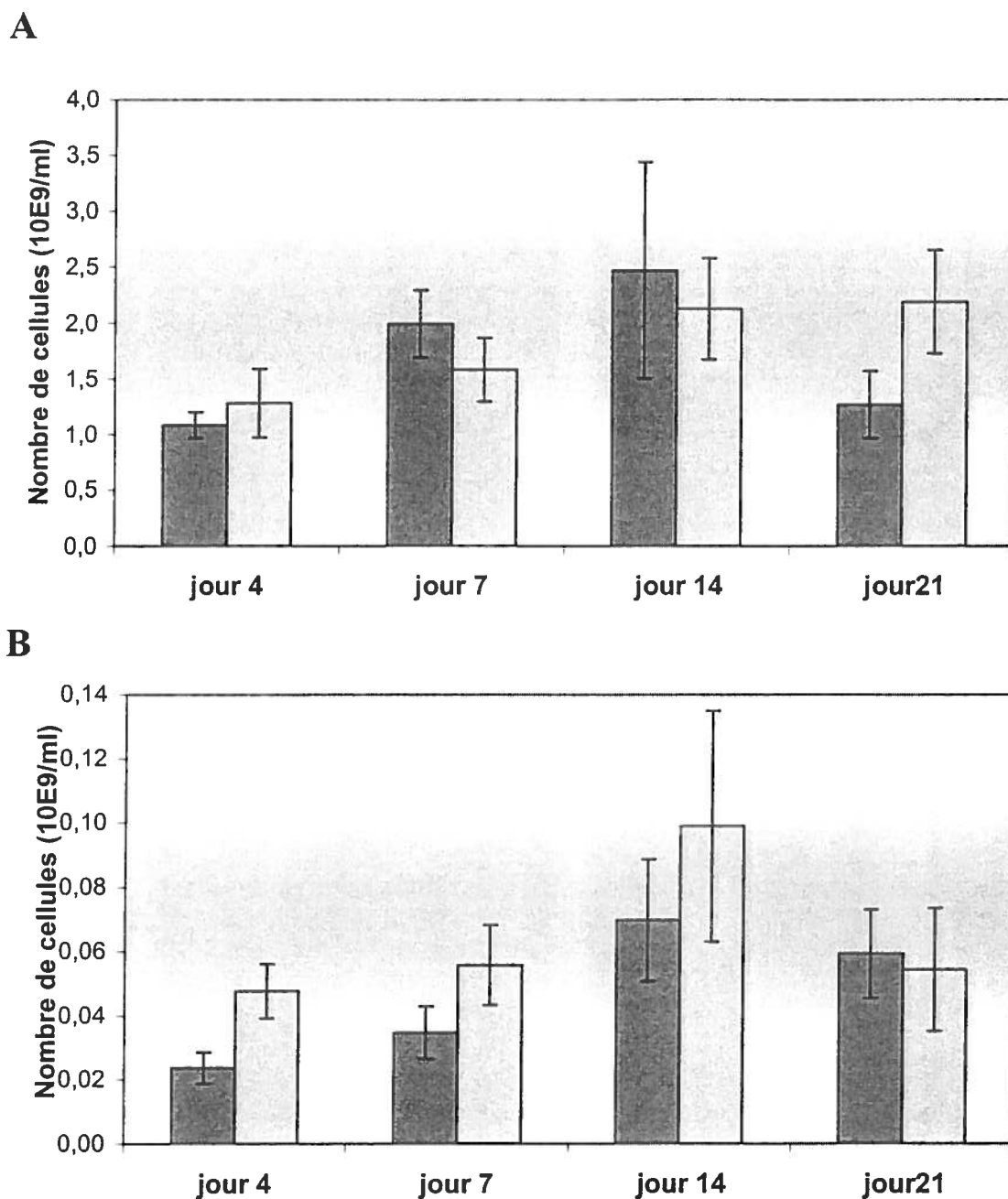


Figure 14. Quantité de cellules exprimant (A) le HLA-DR parmi la population totale des leucocytes (B) simultanément le CD3 et HLA-DR parmi la population de lymphocytes des groupes de patients brûlés (■ Patients a.a., □ Patients gln). Les tests statistiques ne révèlent que des effets temporel significatifs au niveau des deux graphiques, aucun effet glutamine. Les valeurs des tests statistiques sont: figure 14A ($P = 0.022$) et figure 14B ($P = 0.019$). Le récepteur HLA-DR est une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II et elle se retrouve sur des cellules qui ont été activées, c'est-à-dire qui ont reçu un signal pour combattre un agent étranger quelconque. Les différents fluorochromes sont détectés avec la méthode de cytométrie de flux.

Tableau VII. Résumé des différences significatives observées entre les deux groupes de patients brûlés, parmi les résultats obtenus au cours de l'étude. Les tests statistiques effectués sont des ANOVA avec mesures répétées.

Évènement quantifié	Effet temps	Effet groupe	Groupe le plus élevé
Intensité de la phagocytose des granulocytes	> 0.05	0.050	a.a.
Intensité de la phagocytose des monocytes	> 0.05	0.026	a.a.
Expression du CD16b sur les leucocytes	0.001	0.03	a.a.
Expression du CD19 sur les lymphocytes	0.019	0.042	gln
Expression du CD3 sur les lymphocytes	0.001	0.006	gln
Expression du CD3/CD4 sur les lymphocytes	0.001	0.01	gln
Expression du CD3/CD8 sur les lymphocytes	0.001	0.006	gln
Expression du CD11b sur les leucocytes	0.03	0.05	a.a.

Chapitre 5

Discussion

Nous avons étudié les effets d'un supplément de glutamine par voie entérale dans la diète des grands brûlés. Plusieurs études ont prouvé que la glutamine avait des effets bénéfiques à différents niveaux, mais peu d'études n'avaient été réalisées précédemment sur des sujets humains gravement brûlés. L'investigation s'est dirigée du côté du système immunitaire pour essayer de comprendre les fonctions et l'importance de l'implication de la glutamine dans les cas de brûlures graves et pour voir si elle améliore la condition des patients brûlés. Les tests statistiques utilisés ont évalué l'effet du traitement, c'est-à-dire l'effet groupe (différence significative ou pas entre les deux groupes de patients brûlés) et aussi les variations entre les différents jours du protocole, c'est-à-dire l'effet temps.

Les résultats obtenus démontrent qu'un supplément de glutamine, chez des patients brûlés, exerce un effet au niveau du système immunitaire, plus précisément au niveau de l'expression de certaines populations cellulaires. Un fait notable qui démontre que la glutamine est favorable aux grands brûlés est le nombre de décès dans chacun des groupes. Il y a eu 7 décès dans le groupe a.a. et aucun décès dans le groupe gln., de plus le tableau VI démontre bien que la répartition des patients s'est faite de façon égale. En effet, les tests statistiques ne détectent aucune différence significative au niveau de l'âge, de la surface brûlée (TBSA) ou de la surface greffée. Ce qui veut dire que le nombre de décès du groupe a.a. peut difficilement être attribuable au hasard car les patients du groupe glutamine ont une moyenne de TBSA aussi grande que le groupe a.a. Par ailleurs, d'autres membre de notre équipe ont démontré que les suppléments entéraux de glutamine, chez les patients adultes brûlés, réduisent les infections sanguines par un facteur de trois et préviennent la septicémie avec *Pseudomonas aeruginosa* (Garrel, D., communication personnelle). Dans cette étude, ces effets de la glutamine sont évidemment confirmé par des analyses statistiques appropriées.

Le tableau VII (voir au chapitre 4) résume les différences significatives obtenues entre le groupe qui a reçu un supplément de glutamine et celui qui a reçu un mélange isoazoté d'acides aminés. La majorité des différences observées se retrouve au niveau du phénotypage et au niveau du nombre de cellules de certaines sous-populations de leucocytes, quoiqu'une différence soit observée au niveau de l'intensité de la phagocytose des monocytes et des granulocytes. Dans les pages qui vont suivre, une analyse des résultats obtenus sera effectuée en tentant de comprendre à quel niveau se trouve l'implication de cet acide aminé, la glutamine.

5.1 Fonctions des phagocytes

Les fonctions bactéricides des monocytes/macrophages et des neutrophiles sont très altérées suite à des brûlures graves (Heideman et Bengtsson, 1992). Il est reconnu que les neutrophiles sont moins efficaces pour éliminer *Staphylococcus aureus* pendant une longue période après la brûlure (Ogle *et al.*, 1990). Certains investigateurs prétendent que les dérèglements au niveau des fonctions des macrophages seraient causés par des concentrations plasmatiques de glutamine sous la normale (Wallace et Keast, 1992). D'autres (Ogle *et al.*, 1993), prétendent observer une amélioration des fonctions bactéricides chez les neutrophiles après un ajout de glutamine *in vitro*.

5.1.1 Phagocytose

Selon une étude menée par Ogle *et al.* (1994), l'ajout d'une concentration de 20 mmol/L de glutamine *in vitro* à des neutrophiles isolés du sang de patients gravement brûlés améliore les fonctions bactéricides. Ces résultats ont été obtenus lors de tests pour évaluer la capacité des neutrophiles à tuer des bactéries de type *Staphylococcus aureus*, en présence ou pas de glutamine. Lors de cette même étude, il a été observé que la glutamine ne semblait pas augmenter ni l'expression de CR1 (récepteur pour une composante du complément, le C3b) ni la phagocytose.

Les tests que nous avons effectués sont bien différents de l'étude citée ci-haut, tant au niveau des protocoles utilisés que dans la procédure de l'ajout de la glutamine qui s'est faite *in vivo* dans notre expérience. De plus, la comparaison s'est effectuée entre deux groupes de patients brûlés alors que pour eux, un seul et même groupe était en cause, avec ou sans la présence de glutamine. Dans nos résultats, contrairement aux leurs, des différences au niveau de l'intensité de la phagocytose se manifestent. Le seuil de signification est atteint au niveau de la population de neutrophiles ($P = 0.050$) et au niveau de la population de monocytes ($P = 0.026$), avec une différence marquée au jour 7 ($P = 0.001$). Alors comment interpréter le fait que le pourcentage de neutrophiles et de macrophages qui effectuent la phagocytose soit le même, tandis que l'intensité ou l'efficacité du groupe a.a. soit plus élevée? Les cellules provenant des donneurs n'ayant pas reçu de supplément de glutamine seraient plus efficaces pour phagocyter les bactéries ajoutées dans le milieu de culture. Ces résultats vont un peu à l'encontre de la littérature comme, par exemple, l'expérience de Wallace et Keast (1992) où l'ajout de glutamine *in vitro* a favorisé une augmentation du taux de phagocytose d'érythrocytes opsonisés de mouton.

La brûlure provoque des dérangements importants au niveau du tractus gastrointestinal et les dommages faits à la muqueuse peuvent entraîner le phénomène de translocation bactérienne (Fukushima *et al.*, 1994). Des chercheurs ont aussi prouvé qu'un supplément de glutamine dans la diète des grands brûlés améliore l'intégrité de la muqueuse intestinale et que par le fait même, il diminue l'occurrence de la translocation bactérienne (Zapata-Sirvent *et al.*, 1994). Il est donc, concevable de croire que les patients du groupe a.a. aient subi beaucoup plus de translocation bactérienne que le groupe gln. Donc, une translocation plus importante du nombre de bactéries aurait comme effet de stimuler l'activité phagocytaire des neutrophiles. Bien que notre étude ne nous permet pas de vérifier ces faits, il est possible que les neutrophiles du groupe a.a. aient à leur surface plus de récepteurs à opsonines, augmentant ainsi leur activité phagocytaire.

D'autre part, selon l'étude de Wischmeyer (2001), (même si le protocole d'administration de la glutamine n'est pas tout à fait le même que celui utilisé pour le projet) les patients recevant de la glutamine démontrent une diminution de l'inflammation globale et de bactériémie Gram-négative dans le sang. Puisque l'inflammation est caractérisée biochimiquement par une activation du complément, une activation des PMN, un relâchement d'enzymes protéolytiques, la formation de radicaux libres et le relâchement de cytokines comme le TNF, l'IL-1, l'IL-6 (qui iront activer davantage les phagocytes) (Goris, 1996), nous pouvons donc croire que la diminution de l'activité phagocytaire a un effet bénéfique chez les patients ayant reçu de la glutamine. Finalement, la présence de bactéries dans le sang, à elle seule, est bien efficace pour activer la réponse non-spécifique et la phagocytose et démontrer un effet positif de la glutamine, de plus les résultats de cultures bactériennes positives montrent un indice moins élevé chez le groupe recevant de la glutamine. Ces seuls faits sont suffisants pour appuyer l'hypothèse émise au paragraphe précédent.

5.1.2 Flambée oxydative

En ce qui concerne les résultats de l'explosion oxydative, les figures 4A et 4B démontrent que la glutamine ne semble vraiment pas influencer la production de superoxydes, qui est beaucoup plus importante dans la population des granulocytes (neutrophiles) que des macrophages d'ailleurs. Les neutrophiles sont bien reconnus pour leurs fonctions bactéricides et leur production de superoxydes tandis que les macrophages ne font pas que ça. Les macrophages sont aussi impliqués dans un nombre important de processus de la réponse immunitaire spécifique. Selon la même étude discutée précédemment, menée par Ogle *et al.* (1994), la glutamine améliorait l'activité bactéricide des neutrophiles. Par contre, les chercheurs ne savaient pas quelle(s) étape(s) de l'activité bactéricide était améliorée. Ils ont émis l'hypothèse que l'activité rehaussante due à la glutamine n'était probablement pas un effet non-spécifique gluconogénique. L'effet rehaussant de la glutamine sur l'activité bactéricide pouvait se trouver au niveau de la dégranulation, des superoxydes ou autres formations de produits provenant de l'explosion

oxydative ou de la production d'énergie. Il ne faut pas oublier que ces expérimentations ont été faites *in vitro* et que de très grandes concentrations de glutamine ont été utilisées.

En jouant avec les composantes de la diète, certains chercheurs prétendent pouvoir moduler certains paramètres au niveau de l'inflammation (Alexander *et al.*, 1986). Les aliments responsables de cette modulation se retrouvent plutôt dans la composition des lipides. La glutamine n'a pas été reconnue, en général, comme ayant des effets sur le système inflammatoire, mais plus sur le système immunitaire (sauf pour l'étude très récente de Wischmeyer (2001)) (Hammarqvist *et al.*, 1989; Houdijk *et al.*, 1998; Ogle *et al.*, 1994; Wilmore, 2001; Ziegler et Young, 1997). Les neutrophiles sont connus comme étant des médiateurs de l'inflammation, des défenseurs de première ligne et ils sont beaucoup moins impliqués dans le processus de réponse cellulaire. De plus, ils ont beaucoup moins d'interactions avec les lymphocytes qui sont le centre de la réponse immunitaire (Griswold, 1993). Une fois rendus au site où ils ont été attirés, ils font leur travail et ensuite meurent par apoptose.

Ces faits expliquent peut-être la raison de ne pas voir beaucoup d'effets bénéfiques dus à la glutamine au niveau de processus comme la phagocytose ou la flambée oxydative. Peut-être que les effets se trouvent au niveau des lymphocytes et des cellules qui travaillent en coopération avec ces cellules. Il faut aussi noter que la méthode utilisée (avec de la PMA) pour engendrer la flambée oxydative est un moyen artificiel, elle ne reproduit pas toutes les conditions physiologiques normales. On provoque ainsi la flambée oxydative en contournant certaines étapes physiologiques normales et c'est peut être une explication au fait que l'on observe pas les effets voulus, engendrés par le supplément de glutamine.

5.1.3 Potentiel mitochondrial

La mitochondrie est une organelle très importante dans la cellule. C'est la mitochondrie qui est responsable de la production de l'énergie cellulaire grâce à l'ATP qu'elle produit. Le potentiel mitochondrial est un indicateur sensible de l'état énergétique

de la mitochondrie et de la cellule, et il peut être utilisé pour déterminer l'activité des pompes à protons mitochondriales, des système de transport électrogénique et de l'activation de la transition de la perméabilité mitochondriale (Brand *et al.*, 1994; Zoratti et Szabo, 1995). Lors du phénomène de mort cellulaire programmée (apoptose), certains pores de transition de perméabilité mitochondriale, situés dans la membrane mitochondriale interne, sont ouverts et il y a une chute importante du potentiel mitochondrial (Bortner et Cidlowski, 1999). Il existe donc un niveau basal qui peut augmenter selon le degré d'activation des cellules.

Si on regarde les résultats sur l'évaluation du potentiel mitochondrial de chacune des populations de leucocytes des patients (figure 5), on peut voir que l'intensité moyenne du groupe glutamine est généralement plus basse que celle du groupe a.a. pour les différentes journées du protocole, et ce, autant au niveau des granulocytes, des monocytes que des lymphocytes. Cependant, nulle part, les tests statistiques révèlent que le seuil de signification n'a été atteint. On peut donc affirmer qu'il n'y a aucun effet groupe, c'est-à-dire que l'administration de glutamine ne provoque aucune amélioration au niveau du potentiel mitochondrial chez les leucocytes circulants des patients brûlés. Certains pourront croire que ces résultats semblent contradictoires avec la littérature qui existe sur la glutamine. En effet, la glutamine est considérée comme source d'énergie pour les cellules du système immunitaire, ce qui pourrait porter à croire qu'avec plus de glutamine le potentiel mitochondrial devrait inévitablement être plus élevé. Les résultats ne semblent pas démontrer cette affirmation.

5.1.4 Thiols - Glutathion

Le glutathion joue plusieurs rôles importants dans la cellule (Beutler, 1989; Deneke *et al.*, 1985). Il est impliqué dans la synthèse d'ADN, de protéine et aussi des leukotriènes qui sont d'importants médiateurs de l'inflammation (Kan *et al.*, 1988; Rouzer *et al.*, 1982; Suthanthoran *et al.*, 1990). Le glutathion maintient aussi l'état réduit des groupes sulfhydryl de plusieurs protéines, ce qui est requis pour leur fonctionnement normal (Gérard-Monnier et Chaudière, 1996). Il agit comme réserve de cystéine pendant

un manque de nourriture et est une source majeure de cystéine pour les lymphocytes (Cho *et al.*, 1981). En fait, l'activité normale des lymphocytes est dépendante de la disponibilité cellulaire de cet acide aminé sulfuré (Droge *et al.*, 1986). Lors d'une blessure importante comme une brûlure, le stress oxydatif augmente et ce stress est de première importance pour la défense de l'organisme, mais il provoque aussi des effets délétères sur les tissus s'il n'est pas étroitement contrôlé par des antioxydants. Les niveaux de glutathion sont altérés dans plusieurs conditions inflammatoires et des baisses de concentration ont été reportées dans les cas de trauma (Luo *et al.*, 1998; Staal *et al.*, 1992).

Le glutathion est donc un antioxydant majeur nécessaire à la protection des tissus contre les dommages engendrés par les radicaux libres. Il pourrait y avoir une relation entre les effets protecteurs de la glutamine et la biosynthèse du glutathion (Hong *et al.*, 1991). Le glutathion est un tripeptide constitué de glutamate, cystéine et glycine, et sous des conditions expérimentales, la portion glutamate de la molécule est dérivée de la glutamine (Cook *et Peters*, 1986). L'évaluation de la quantité de thiols de petits poids moléculaire est un test utilisé pour évaluer les niveaux de glutathion cellulaire. En regardant la figure 6, on remarque que le schéma semble se ressembler pour les trois sous-populations de cellules (Figure 6A, B ou C). Au jour 4, l'intensité moyenne du groupe gln est plus basse que celle du groupe a.a. et pour les autres jours, c'est le contraire. Les tests statistiques révèlent qu'à aucun endroit les différences ne sont significatives. Il est donc possible d'affirmer que dans le cadre de ces expériences, le supplément de glutamine ne semble pas avoir des effets sur la quantité de glutathion présente dans les leucocytes sanguins des patients brûlés.

5.2 Analyse des populations de leucocytes

En regardant le tableau VII, on peut voir que les suppléments de glutamine ont vraiment une influence sur certaines populations cellulaires. Le phénomène est probablement dû au fait que la glutamine est directement impliquée dans les phénomènes de division rapide des cellules, car elle est un précurseur pour la biosynthèse des

nucléotide et parce que la glutamine est essentielle pour la transcription de gènes de protéines sécrétées durant le challenge antigénique (Labow et Souba, 2000). De plus, la glutamine est utilisée directement pour la synthèse des protéines ou comme précurseur pour la formation d'autres acides aminés (Jepson *et al.*, 1988).

5.2.1 Les neutrophiles/CD16b

Le récepteur CD16b est un récepteur caractéristique des neutrophiles. Le groupe recevant de la glutamine possède, donc, un nombre de neutrophiles plus bas que le groupe a.a. au jour 7, et la différence est significative ($P = 0.03$). Cette différence engendre un effet global significatif ($P = 0.05$). par contre, pour les autres jours du protocole les différences sont beaucoup moins marquées, et même qu'aux jour 4 et 14 c'est le groupe glutamine qui est plus élevé. Les neutrophiles agissent comme première ligne de défense, en attendant que la réponse cellulaire spécifique se mette en branle. Donc plus la quantité d'envahisseurs est grande (antigènes, bactéries...), plus le système aura un signal intense pour que les cellules précurseurs des neutrophiles se différencient. Cette théorie implique donc qu'il y aurait plus de translocation bactérienne chez les patients de groupe recevant les acides aminés, donnant ainsi un signal d'alarme plus grand au système immunitaire. C'est peut-être pour cette raison que la quantité de neutrophiles est significativement plus importante dans le groupe a.a. au jour 7 de la réponse immunitaire.

5.2.2 Les macrophages/CD14

Le récepteur CD14 est ancré à la membrane extracellulaire par une GPI, mais on peut aussi le retrouver sous forme soluble, comme le CD16b (Ziegler-Heitbroc et Ulevitch, 1993). Le CD14 est le récepteur cellulaire majeur pour les complexes de LPS et pour une protéine plasmatique qui se lie aux LPS. Cette protéine qui se lie aux LPS est une protéine de phase aiguë produite par le foie et qui catalyse la liaison du CD14 et des LPS (Hailman *et al.*, 1994). Quand le CD14 est lié à des complexes de LPS, il y a induction la production de cytokines proinflammatoires et de radicaux d'oxygène chez les macrophages et l'expression de molécules d'adhésion est augmentée sur leur surface

cellulaire (Ferrero et al., 1993). Selon Bosco *et al.* (1997), le CD14 jouerait aussi un rôle critique dans la réponse des monocytes/macrophages face à l'IL-2.

Le récepteur cellulaire CD14 a été utilisé pour quantifier le pourcentage de monocytes/macrophages présents dans le sang périphérique des patients. Les analyses statistiques ne démontrent pas de différence significative entre les deux groupes pour les résultats de la figure 8. Donc l'administration de glutamine par voie entérale ne semble pas affecter le nombre de macrophages ou monocytes chez les patients brûlés. Selon les tests statistiques, il est démontré qu'il y a une augmentation progressive du nombre de monocytes circulants entre le jour 4 et 21 parmi les deux groupes de patients ($P = 0.003$).

5.2.3 Les lymphocytes

5.2.3.1 Les lymphocyte B/CD19

Les résultats sur le phénotypage de la population de lymphocytes B (figure 9) démontrent qu'aux premiers jours du protocole, le groupe glutamine possède un plus grand nombre de lymphocytes B que le groupe recevant les acides aminés ($P = 0.042$). Les analyses statistiques confirment que le temps influence aussi le nombre de lymphocytes B circulant et ce, parmi les deux groupes de patients brûlés ($P = 0.019$). Ce qui est important, c'est de retenir qu'il y a une différence marquée entre les deux groupes au jour 7 ($P = 0.026$) et que cette différence est induite par le traitement de la glutamine et non due au hasard. Il est donc possible d'affirmer que l'administration de glutamine exerce des effets à certains niveaux. Comme il a été mentionné ci-haut, les lymphocytes B jouent vraiment un rôle important dans la réponse immunitaire, alors cette augmentation significative peut avoir des effets positifs sur la condition des patients brûlés. Par exemple, certaines bactéries possèdent des capsules de polysaccharides qui ne sont pas reconnues par les récepteurs qui stimulent la phagocytose sur les macrophages ou les neutrophiles. Ce genre de bactéries ne peut être éliminé que par la fixation du complément et des anticorps (l'opsonisation), rendant ainsi la phagocytose possible. Ce qui amène à dire que plus la quantité d'anticorps est élevé, plus le niveau de défense est

efficace et si le nombre de lymphocytes B est plus élevé, la production d'anticorps devrait l'être aussi.

Par contre, selon la littérature (Waymack et al., 1989), le problème ne se situe pas au niveau de la quantité de lymphocytes B, mais bien au niveau de l'efficacité de leur réponse et production d'anticorps. Alors pour y voir les effets de la glutamine, il aurait probablement été préférable de tester la production d'anticorps. Mais de tel essais impliquent des méthodes compliquées, car il faut d'abord isoler la population cible et effectuer des expériences qui durent plusieurs jours. Ceci aurait demandé probablement une quantité beaucoup plus grande de sang, alors que nous savons très bien que ça pourrait compliquer l'état du patient.

5.2.3.2 Les lymphocytes T/CD3

Une grande partie du phénotypage à été consacrée à la population de lymphocytes T. Cette population de cellules est la plus importante au niveau de la réponse immunitaire cellulaire spécifique. Les lymphocytes T sont les chefs d'orchestre de la réponse immunitaire. De plus, c'est une population qui se trouve grandement affectée lorsque le corps subit des brûlures importantes. Plusieurs études ont été menées pour connaître l'importance de la glutamine au niveau du métabolisme des lymphocytes T. Il se trouve que la glutamine est un substrat préférentiel pour cette population de cellules, elle est indispensable à leur prolifération. L'étude que nous avons menée appuie cette théorie, car les résultats démontrent des différences significatives entre les deux groupes de patients brûlés et ce, non seulement au niveau de la population générale de lymphocyte T, mais aussi au niveau des lymphocytes T collaborateurs et cytotoxiques. Avec la reconnaissance du CD3, la population de lymphocyte T a pu être quantifiée. Il est certain que la glutamine n'a pas rétabli complètement le pourcentage de lymphocytes T, si on compare avec des sujets sains qui n'ont pas subi de brûlure (données non présentées), mais les analyses statistiques prouvent que le groupe glutamine est significativement plus élevé que le groupe a.a. ($P = 0.006$). Cette augmentation est peut-être suffisante pour améliorer la condition des patients brûlés. De plus, peut-être que la glutamine améliore

l'efficacité de la réponse des cellules T et que même si le pourcentage de la population de lymphocytes T n'est pas complètement rétabli, ceux qui sont présents fonctionnent mieux que ceux du groupe recevant le mélange d'acides aminés. Alors la glutamine ferait augmenter légèrement la quantité de lymphocytes T, mais surtout elle améliorerait l'efficacité de leur réponse. L'évaluation du nombre de lymphocytes T parmi la population de lymphocytes est significativement plus élevée, pour le groupe gln, au jour 7 (figure 10B), de même que les sous-populations de lymphocytes T collaborateurs et suppresseurs (figure 11 et 12 respectivement).

5.2.3.3 Les sous-populations de lymphocytes/CD4 et CD8

En se liant aux molécules du CMH de classe II, le CD4 sert de co-récepteur durant la reconnaissance des antigènes par le TCR. Ce phénomène résulte en une augmentation marquée de la sensibilité de la cellule T envers l'antigène présenté par le CMH de classe II, abaissant efficacement la dose d'antigènes requise d'environ 100 fois pour une activation adéquate (Janeway *et al.*, 1988). Le CD4 augmente l'activation des cellules T de deux façons: il stabilise le complexe TCR/peptide/CMH et augmente la transduction de signal. Ainsi, on croit que l'activation optimale des cellules T nécessite la ligation du CD4 à la même molécule du CMH que le TCR (Janeway, 1992). Plusieurs autres rôles importants pour le CD4 ont bien été documentés. Son interaction durant le développement des thymocytes est critique pour leur différenciation (Kruisbeek *et al.*, 1985). Le CD4 a aussi été reporté comme récepteur pour l'IL-16 qui induit le chimiotactisme des cellules CD4⁺ et qui est un facteur de croissance pour ces cellules (Center *et al.*, 1996). Il y a des évidences récentes qui prouvent un rôle direct pour le CD4 dans l'apoptose et la neurodégénération, démontrant ainsi que les propriétés fonctionnelles du CD4 sont apparemment remarquablement variées (Algeciras *et al.*, 1998; Buttini *et al.*, 1998). L'augmentation significative ($P = 0.01$) de la quantité de lymphocytes T exprimant le CD4, c'est-à-dire la population de lymphocytes T auxiliaires, dans le groupe de patients recevant la glutamine, contribue sûrement aux effets bénéfiques si l'on prend en considération l'importance des rôles mentionnés ci-haut.

Le CD8, par contre, contribue à la stabilisation des interactions entre le lymphocyte T et la cellule cible à travers la reconnaissance de sites monomorphiques exprimés sur le CMH de classe I des cellules cibles (Salter *et al.*, 1989). Les lymphocytes T suppresseurs (CD8⁺) sont chargés de maintenir la réaction immunitaire spécifique dans certaines limites et d'y mettre fin lorsqu'elle n'a plus raison d'être (Janeway, 1997). De plus, comme le CD4, le CD8 est une molécule précieuse dans le développement des thymocytes et dans la transduction des signaux intracellulaires qui sont importants pour l'activation des cellules T (Fung-Leung *et al.*, 1993). Peut-être qu'une plus grande quantité de cellules CD8⁺ dans le sang des patients du groupe glutamine contribue à contrôler davantage la réaction immunitaire dans des proportions normales, diminuant ainsi les dommages tissulaires engendrés par des réactions trop vives.

5.2.4 Expression des marqueurs d'activation

5.2.4.1 Expression du CD11b

Le récepteur CD11b en association avec le CD18 est connu sous le nom de MAC-1 ou CR3. Il est reconnu pour jouer un rôle dans les phénomènes d'adhésion cellulaire lors de processus comme la phagocytose. Ce complexe moléculaire est impliqué dans l'adhésion ferme des neutrophiles aux cellules endothéliales (Hentzen *et al.*, 2000). Il est aussi un récepteur membranaire capable d'effectuer de la signalisation transmembranaire et d'être un médiateur de la phagocytose, de réactions cytotoxiques et de chimiotactisme (Ross et Větvička, 1993; Shalekoff *et al.*, 1998). Une molécule d'adhésion intercellulaire appelée ICAM-1 ou CD54 est un des ligands importants du complexe CD11b-CD18. L'ICAM-1 fait partie de la superfamille des immunoglobulines qui est largement exprimée sur l'endothélium vasculaire et sur certaines cellules parenchymateuses en réponse à une activation via des cytokines ou des endotoxines (Dustin et Springer, 1988). Le CD11b/CD18 est exprimé sur les cellules phagocytaires, les NK, une sous-population mineure de cellules B CD5⁺ et les lymphocytes T CD8⁺ (Ross et Větvička, 1993).

Le CD11b est aussi considéré comme un marqueur de l'activation des cellules. Il semblerait que le supplément de glutamine ne soit pas efficace pour faire augmenter le

nombre de cellules exprimant ce récepteur. Enfin, c'est ce que les résultats démontrent (figure 14). En effet, le groupe glutamine possède des quantités de cellules CD11b⁺ plus basses aux jours 7, 14 et 21 et les tests statistiques révèlent qu'il y a une différence significative globale entre les deux groupes de patients ($P = 0.05$). Ce qui est intéressant, par contre, avec ce résultat, c'est qu'il viendrait peut-être expliquer les différences obtenues au niveau de l'intensité de la phagocytose. En effet, ce récepteur est impliqué dans l'efficacité du processus de phagocytose. S'il y a une baisse de cette population de cellule du côté du groupe gln. ça pourrait expliquer pourquoi l'intensité de la phagocytose est moins élevée. Il ne faut pas interpréter ces résultats de façon négative pour autant. Peut-être qu'une diminution de cette population exprimant des marqueurs d'activation peut entraîner des effets bénéfiques car il est reconnu que les patients brûlés souffrent d'un surplus de certains médiateurs chimiques (O'Sullivan et O'Connor, 1997).

5.2.4.2 Expression des antigènes de classe II du CMH/HLA-DR

Les molécules de type HLA II sont des glycoprotéines composées de deux chaînes (α et β) qui forment une partie du système de la reconnaissance immunitaire; essentiellement, c'est l'habilité à reconnaître le "soi" du "non-soi". Leur rôle est de présenter des peptides dérivés d'antigènes étrangers aux cellules T auxiliaires pour permettre la destruction de ces cellules ne faisant pas partie du "soi". Ces molécules sont activement impliquées dans le rejet de greffes ou de transplantations d'organes (Colombani, 1993). Dans le thymus, les molécules HLA II sont exprimées sur les cellules épithéliales du cortex et de la médulla ainsi que sur les cellules dendritiques d'origine hématopoïétique, intervenant ainsi dans la sélection thymique des lymphocytes T, la génération et la purge du répertoire T (Colombani, 1993).

Les molécules du CMH de classe II sont directement responsables de la qualité de la réponse des lymphocytes T. Le HLA-DR est aussi considéré comme un marqueur d'activation. En étant responsable de la présentation de l'antigène, les molécules du CMH classe II influenceront tout le déroulement subséquent de la réponse cellulaire. Il y a une courbe ascendante au long des jours du protocole pour cette population de cellules, et ce

pour les deux groupes de patients. Les analyses statistiques révèlent qu'il y a un effet temps significatif pour les deux figures (14A et 14B), c'est-à-dire le nombre de cellules exprimant les molécules de HLA-DR parmi tous les leucocytes sanguins et parmi les lymphocytes. Cependant, aucune différence significative n'a été détectée entre les deux groupes de patients brûlés. Ces résultats démontrent que la quantité de lymphocytes activés augmente au fil des jours, mais que la glutamine ne semble pas influencer la population exprimant ce récepteur dans les deux groupes de patients brûlés.

5.3 Analyse des points forts et des limites de l'étude

Il est certains que chaque étude comporte des points forts et d'autres aspects un peu plus faibles. Cependant, bien souvent ceux-ci ont leur raison d'être dans l'étude et les forces compensent pour les faiblesses. Un des points forts de l'étude est que même si les patients ont été distribués de façon aléatoire dans les deux groupes, la répartition s'est faite également, donc les différences qui ont été obtenues au niveau des résultats peuvent vraiment être prises en considération car elles ne sont pas dues au hasard.

Cette étude sur l'effet de l'administration de la glutamine par voie entérale a pu détecter des changements significatifs au niveau de certaines populations de leucocytes, par contre, il n'a pas été possible de faire une grande variété de tests qui auraient pu témoigner de l'efficacité de ces populations à jouer leur rôle dans la réponse immunitaire. Une quantité de sang beaucoup plus grande aurait été nécessaire pour effectuer des tests de prolifération, par exemple, ou des tests de production d'anticorps qui sont beaucoup plus complexes. Ce genre de test aurait pu révéler de l'information importante sur les effets d'un supplément de glutamine, mais une prise de sang plus importante aurait pu affecter gravement les patients. Un autre point faible de cette étude a été la variation du "n" des deux groupes pour chacun des paramètres étudiés. Cette variation a été causée par le décès ou la sortie du protocole (à cause de l'extubation) de certains patients. De plus, les comptes cellulaires ont été effectués par le laboratoire de biochimie à l'Hôtel-Dieu et à certains jours, des données étaient manquantes. Cette variation de "n" diminue la puissance statistique des tests effectués.

Un point avantageux de cette étude, est d'avoir pu effectuer des analyses sur des sujets humains en conditions critiques. De plus, contrairement à toutes les autres études effectuées jusqu'à maintenant, le supplément de glutamine s'est fait *in vivo* et par voie entérale (et non par voie intraveineuse). Ceci implique donc que tout le métabolisme a pu bénéficier de ce supplément ce qui est très différent d'une expérience en éprouvette qui ne reproduit pas toutes les conditions expérimentales.

5.4 Analyse globale des effets de la glutamine

Nous avons observé que l'intensité de la phagocytose est diminuée dans le groupe de patients recevant la glutamine, autant chez les neutrophiles que chez les monocytes. Ce fait permet d'émettre l'hypothèse que le niveau de stress oxydatif pourrait être plus bas dans le groupe glutamine, apportant ainsi un effet positif sur la réponse immunitaire. En accord avec cette hypothèse, des études ont démontré l'importance de la glutamine impliquée dans le métabolisme du glutathion réduit et dans la régulation de l'état d'oxydo-réduction cellulaire (Mates *et al.*, 2002; Roth *et al.*, 2002).

Une seconde observation importante de ce travail est l'augmentation des populations de lymphocytes T (collaborateurs et cytotoxiques) et de lymphocytes B. Certaines études démontrent que la glutamine serait impliquée dans la prévention de l'apoptose différents types de cellules (Exner *et al.*, 2002; Mates *et al.*, 2002; Mendonca *et al.*, 2002). Donc la prévention de l'apoptose des lymphocytes T et B grâce aux effet du supplément de glutamine pourrait expliquer les résultats obtenus pour cette étude. Il serait envisageable de croire que la glutamine a aussi favorisé un meilleur fonctionnement des populations de lymphocytes améliorant ainsi les processus de collaboration cellulaires. La collaboration entre les cellules se fait à plusieurs niveaux, c'est-à-dire entre lymphocytes T collaborateurs mais aussi de lymphocytes T collaborateurs à lymphocytes T suppresseurs et de lymphocytes T collaborateurs à lymphocytes B. L'amélioration des interactions cellule-cellule, quelle soit qualitative ou quantitative, aura pour effet d'augmenter l'efficacité de la réponse immunitaire, ce qui pourrait expliquer en parti la diminution des infections dans la cohorte de patients traités avec la glutamine.

Chapitre 6

Conclusion

Cette étude avait pour objectif de vérifier les effets d'un supplément de glutamine, administré par voie entérale, dans la diète chez des patients gravement brûlés. L'hypothèse de départ était que la glutamine améliorerait les fonctions immunitaires et diminuerait l'occurrence des infections. Plus précisément, qu'elle provoquerait une augmentation de l'activité phagocytaire des neutrophiles et une amélioration dans les sous-populations de leucocytes et que le résultat global de ces améliorations se démontrerait par une diminution de la durée des soins, du taux de mortalité et de morbidité.

Les paramètres qui ont été étudiés sont: la phagocytose, la flambée oxydative, le potentiel mitochondrial, les thiols et la caractérisation du phénotype des leucocytes circulants.

Chez les patients ayant reçu de la glutamine, une diminution de l'intensité de la phagocytose par les neutrophiles et les monocytes, une diminution des populations de cellules exprimant le CD16b et le CD11b et une augmentation des populations de lymphocytes B et T (collaborateur et cytotoxiques) ont été démontrés. De plus, 7 décès ont été observés dans le groupe témoin comparativement à aucun dans le groupe recevant de la glutamine. De plus, d'autre membre de notre équipe, effectuant des tests à partir des même groupes de patients que notre étude, nous confirment que la glutamine prévient la septicémie et diminue l'occurrence des infections sanguines par un facteur de trois.

La conclusion générale que l'on peut tirer de cette étude est qu'un supplément de glutamine, administré dans la diète des grands brûlés par voie entérale, exerce un effet favorable sur le système immunitaire des grands brûlés et diminue le taux de mortalité et morbidité. Ces effets positifs se traduiraient probablement par une diminution du stress

oxydatif et une résistance à l'apoptose des lymphocytes. Donc, il nous est possible de croire que le supplément de glutamine permet une meilleure collaboration entre les cellules du système immunitaire et ainsi augmenterait l'efficacité du système de défense des organismes.

On ne connaît pas encore exactement les mécanismes impliqués dans les effets de la glutamine. Afin d'approfondir cet aspect, des études au niveau de la fonction des cellules immunitaires seraient importantes. Par exemple, il serait bon de déterminer la capacité des lymphocytes à proliférer, la sécrétion de cytokines inflammatoires, la production d'anticorps. De plus, une attention particulière devrait être faite sur le système de défense oxydatif et sur les protéines anti-apoptotiques chez les lymphocytes. En conclusion, notre étude sur l'effet de la glutamine sur certains paramètres du système immunitaire montre des effets bénéfiques de celle-ci.

Liste de références

ABBAS, A.K., MURPHY, K.M. et SHER, A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. **Vol. 383**: pp. 787-793.

ABCOUWER, S.F., BODE, B.P. et SOUBA, W.W. 1996. Glutamine as a metabolic intermediate. Dans: Nutrition ad metabolism in the surgical patient. FISHER, J.E., Éditeur, Boston, Little, Brown. pp. 353-384.

ALEXANDER, J.W., MCMILLAN, B.G., STINNETT, J.D., OGLE, C.K., BOZIAN, R.C., FISHER, J.E., OAKES, J.B., MORRIS, M.J. et KRUMMEL, R. 1980. Beneficial effects of aggressive protein feeding in severely burned children. *Ann. Surg.* **Vol. 192(4)**: pp. 505-517.

ALEXANDER, J.W. 1986. The importance of lipid type in the diet after burn injury. *Ann. Surg.* **Vol. 204(1)**: pp. 1-8.

ALEXANDER, J.W. et GOTTSCHLICH, M.M. 1990. Nutritionnal imunomodulation in burn patient. *Crit. Care Med.* **Vol. 18(2)**: pp. S149-S153.

ALGECIRAS, A., DOCKRELL, D.H., LYNCH, D.H. et PAYA, C.V. 1998. CD4 regulates susceptibility to Fas ligand- and tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.* **Vol. 187(5)**: pp. 711-720.

ALVERDY, J.A., AOYS, E., WEISS-CARRINGTON, P. et BURKE, D.A. 1992. The effect of glutamine-enriched TPN on gut immune cellularity. *J. Surg, Res.* **Vol. 52(1)**: pp. 34-38.

ARDAWI, M.S.M. et NEWSHOLME, E.A. 1985. Metabolism in lymphocytes and its importance in the immune response. *Essays Biochem.* **Vol. 21**: pp. 44-53.

BABCOCK, B., ALEXANDER, J.W. et WARDEN, G. 1990. Flow cytometric analysis of neutrophil subsets in thermally injured patients developing infection. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **Vol. 54**: pp. 117-125.

BARACOS, V.E. 1990. Régulation du métabolisme protéique musculaire: Importance des prostaglandines et des cytokines produites par les cellules phagocytaires mononucléaires. *Clin. Métabol.* **Vol. 4**: pp. 91-98.

BARBER, A.E., JONES, W.G.^{2^{ème}}, MINEI, J.P., FAHEY, T.J.^{3^{ème}}, MOLDAWER, L.L., RAYBURN, J.L., FISHER, E., KEOGH, C.V., SHIRES, G.T. et LOWRY, S.F. 1990. Harry M. Vars award. Glutamine or fiber supplementation of a defined formula diet: impact on bacterial translocation, tissue composition, and response to endotoxin. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* **Vol. 14(4)**: pp. 335-343.

BARLOW, Y. 1994. T lymphocytes and immunosuppression in the burned patient: a review. *Burns*. Vol. 20(6): pp. 487-490.

BASS, D.A., PARCE, J.W., DECHATELET, L.R., SZEJDA, P., SEEDS, M.C. et THOMAS, M. 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.* Vol. 130(4): pp. 1910-1917.

BENGTSSON, A. et HEIDEMAN, M. 1987. Anaphylatoxin formation in plasma and burn bullae fluid in the thermally injured patient. *Burns Incl. Therm. Inj.* Vol. 13(3): pp. 185-189.

BENGTSSON, A. et HEIDEMAN, M. 1988. Anaphylatoxin formation in sepsis. *Arch. Surg.* Vol. 123(5) : pp. 645-649.

BEUTLER, E. 1989. Nutritional and metabolic aspects of glutathione. *Ann. Rev. Nutr.* Vol. (9): pp. 287-302.

BORTNER, C.D. et CIDLOWSKI, J.A. 1999. Caspase independent/dependant regulation of K^+ , cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *J. Biol. Chem.* Vol. 274(31): pp. 21953-21962.

BOSCO, M.C., ESPINOZA-DELGADO, I., ROWE, T.K., MALABARBA, M.G., LONGO, D.L. et VARESI, L. 1997. Functional role for the myeloid differentiation antigen CD14 in the activation of human monocytes by IL-2. *J. Immunol.* Vol. 159: pp. 2922-2931.

BOUSSIOTIS, V.A., FREEMAN, G.J., BEREZOVSKAYA, A., BARBER, D.L., et NADLER, L.M. 1997. Maintenance of human T cell anergy: Blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science* Vol. 278: pp. 124-128.

BD, M.D., CHIEN, L.F., AINSCOW, E.A., ROLFE, D.F. et PORTER, R.K. 1994. The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochim. Biophys. Acta.* Vol. 1187: pp. 132-139.

BURKE, D.J., ALVERDY, J.C., AOYS, E. et MOSS, G.S. 1989. Glutamine-supplemented total parenteral nutrition improves gut immune function. *Arch. Surg.* Vol. 124(12): pp. 1396-1399.

BUTTINI, M., WESTLAND, C.E., MASLIAH, E., YAFEH, A.M., WYSS-CORAY, T., MUCKE, L. 1998. Novel role of human CD4 molecule identified in neurodegeneration. *Nat. Med.* Vol. 4(4): pp. 441-446.

CARPENTIER, Y.A., ASKANAZI, J., ELWYN, D.H., JEEVANANDAM, M., GUMP, F.E., HYMAN, A.I., BURR, R. et KINNEY, J.M. 1979. Effects of hypercaloric glucose infusion on lipid metabolism in injury and sepsis. *J. Trauma.* Vol. 19(9): pp. 649-654.

CENTER, D.M., KORNFELD, H., CRUIKSHANK, W.W. 1996. Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol. Today* Vol. 17(10): pp. 476-481.

CHO, E.S., SAHYOUN, N. et STEGINK, L.D. 1981. Tissue glutathione as a cyst(e)ine reservoir during fasting and refeeding of rats. *J. Nutr.* Vol. 111(5): pp. 914-922.

CLARK, A.S., KELLY, R.A. et MITCH, W.E. 1984. Systemic response to thermal injury in rats. Accelerated protein degradation and altered glucose utilization in muscle. *J. Clin. Invest.* Vol. 74(3): pp. 888-897.

CLEVERS, H., ALARCON, B., WILEMAN, T. et TERHORST, C. 1988. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu. Rev. Immunol.* Vol. 6: pp. 629-662.

COLOMBANI, J. 1993. HLA. Fonctions immunitaires et applications médicales. Collection Clé pour Médecine-Sciences. Editeur: John Libbey Eurotext.

COOK, N.D. et PETERS J.D. 1986. The simultaneous hydrolysis of glutathione and glutamine by rat kidney gamma-glutamyl transferase. *Biochim. Biophys. Acta.* Vol. 884: pp.207-210.

CUNNINGHAM, J.J., HEGARTY, M.T., MEARA, P.A. et BURKE, J.F. 1989. Measured and predicted calorie requirements of adult during recovery from severe burn trauma. *Am. J. Clin. Nutr.* Vol. 49: pp. 404-408.

CURRERI, P.W., RICHMOND, D., MARVIN, J. et BAXTER, C.R. 1974. Dietary requirements of patients with major burns. *J. Am. Diet Assoc.* Vol. 65(4): pp. 415-417.

CURTHOYS, N.P. et WATFORD, M. 1995. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* Vol. 15: pp. 133-159.

CYNOBER, L., SAIZY, R., NGUYEN, D.F., DREYSSE, C., LIORET, N. et MOUSSET, L. 1982. Les variations de la cortisolémie chez le brûlé et leur relation avec celles des acides aminés plasmatiques. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* Vol. 1(3): pp. 307-312.

CYNOBER, L. 1989. Amino acid metabolism in thermal burns. *JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.* Vol. 13(2): pp.196-205.

DARCY-VRILLON, B., POSHO, L., MOREL, M.T., BERNARD, F., BLANCHIER, F., MESLIN, J.C. et DUEE, P.H. 1994. Glucose, galactose and glutamine metabolism in pig isolated enterocytes during development. *Pediatr. Res.* Vol. 36(2): pp. 175-181.

DE, A.K., KODYS, K.M., PUYANA, J.C., FUEDEM, G., PELLEGRINI, J. et MILLER-GRAZIANO, C.L. 1997. Only a subset of trauma patients with depressed mitogen responses have true T cell dysfunctions. *Clin. Immunol. Immunopathol.* Vol. 82: pp. 73-82.

DE, A.K., KODYS, K.M., PELLEGRINI, J., YEH, B., FURSE, R.K., BANKEY, P. et MILLER-GRAZIANO, C.L. 2000. Induction of global anergy rather than inhibitory Th2 lymphokines mediates posttrauma T cell immunodepression. *Clin. Immunol.* Vol. 96(1): pp. 52-66.

DEFERRARI, G., GARIBOTTO, G., SAFFIOTI, S., RUSSO, R., SALA, M.R., BRUZZONE, M. et TIZIANELLO, A. 1994. Renal ammoniogenesis and interorgan flow of glutamine in chronic metabolic acidosis. *Contrib. Nephrol.* Vol. 110: pp. 144-149.

DEMLING, R.H. et DEBIASSE, M.A. 1995. Micronutriments in critical illness. *Crit. Care. Clin.* Vol. 11(3): pp. 651-673.

DEMLING, R.H. et SEIGNE, P. 2000. Metabolic management of patient with severe burns. *World J. Surg.* Vol. 24: pp. 673-680.

DENEKE, S.M., LYNCH, B.A. et FANBURG, B.L. 1985. Effects of low protein diets or feed restriction on rats lung glutathione and oxygen toxicity. *J. Nutr.* Vol. 115(6): pp. 726-732.

DROGE, W., POTTMEYER-GERBER, C., SCHMIDT, H. et NICK, S. 1986. Glutathione augments the activation of cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Immunobiol.* Vol. 172(1-2): pp. 151-156.

DUCHEN, M.R. 1999. Contribution of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J. Physiol.* Vol. 516(1): pp. 1-17.

DUSTIN, M.L. et SPRINGER, T.A. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J. Cell. Biol.* Vol. 107(1): pp. 321-331.

EDBERG, J.C., MOON, J.J., CHANG, D.J. et KIMBERLY, R.P. 1998. Differential regulation of human neutrophil Fc γ RIIIa (CD32) and Fc γ RIIIb (CD16)-induced Ca²⁺ transients. *J. Biol. Chem.* Vol. 273(14): pp. 8071-8079.

EXNER, R., WEINGARTMANN, G., ELIASSEN, M.M., GERNER, C., SPITTLER, A., ROTH, E. et OEHLER, R. 2002. Glutamine deficiency renders human monocytic cells more susceptible to specific apoptosis triggers. *Surgery.* Vol. 131(1): pp. 75-80.

FANG, C.H., JAMES, H.J., OGLE, C., FISHER, J.E. et HASSELGREN, P.O. 1995. Influence of burn injury on protein metabolism in different types of skeletal muscle and the role of glucocorticoids. *J. Am. Coll. Surg.* Vol. 180(1): pp. 33-42.

FERRERO, E., TSUBERI, B.Z., TESIO, L., RONG, G.W., HAZIOT, A. et GOYERT, S.M. 1993. Transgenic mice expressing human CD14 are hypersensitive to lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 90: pp. 2380-2384.

- FRANDJI, P., OSKERITZIAN, C., CACARACI, F., LAPEYRE, J., PERONET, R., DAVID, B., GUILLET, J.G. et MECHERI, S. 1993. Antigen-dependant stimulation by bone marrow-derived mast cells of MHC class II-restricted T cell hybridoma. *J. Immunol.* **Vol. 151(11)**: p. 6318-6328.
- FUKUSHIMA, R., GIANOTTI, L., ALEXANDER, J.W. 1994. The primary site of bacterial translocation. *Arch. Surg.* **Vol. 129**: pp. 53-58.
- FUKUSHIMA, R., GIANOTTI, L., ALEXANDER, J.W. et PYLES, T. 1992. The degree of bacterial translocation is a determinant factor for mortality after burn injury and is improved by prostaglandin analogs. *Ann. Surg.* **Vol. 216(4)**: pp. 438-445.
- FUNG-LEUNG, W.P., LOUIE, M.C., LIMMER, A., OHASHI, P.S., NGO, K., CHEN, L., KAWAI, K., LACY, E., LOH, D.Y. et MAK, T.W. 1993. The lack of CD8 alpha cytoplasmic domain resulted in a dramatic decrease in efficiency in thymic maturation but only a moderate reduction in cytotoxic function of CD8+ T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **Vol. 23(11)**: pp. 2834-2840.
- GARREL, D.R., RAZI, R., LARIVIÈRE, F., JOBIN, N., NAMAN, N., EMPTOZ-BONNETON, A. et PUGEAT, M.M. 1995. Improved clinical status and length of care with low-fat nutrition support in burn patients. *JPEN. J. Parent. Ent. Nut.* **Vol. 19(6)**: pp. 482-491.
- GENNARI, R. et ALEXANDER, J.W. 1997. Arginine, glutamine, and dehydroepiandrosterone reverse the immunosuppressive effect of prednisone during gut-derived sepsis. *Crit. Care Med.* **Vol. 25(7)**: pp. 1207-1214.
- GERARD-MONNIER, D. et CHAUDIERE, J. 1996. Metabolism and antioxidant of glutathione. *Pathol. Biol. (Paris)* **Vol. 44(1)**: pp. 77-85.
- GHIBELLI, L., FANELLI, C., ROTILIO, G., LAFAVIA, E., COPPOLA, S., COLUSSI, C., CIVITAREALE, P. et CIRIOLO, M.R. 1998. Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB J.* **Vol. 12**: pp. 479-486.
- GIANOTTI, L., ALEXANDER, J.W., PYLES, T. et FUKUSHIMA, R. 1993. Arginine-supplemented diets improve survival in gut-derived sepsis and peritonitis by modulating bacterial clearance. *Ann. Surg.* **Vol. 217(6)**: pp. 644-654.
- GOONOW, C.C. 1996. Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **Vol. 93**: pp. 2264-2271.
- GORE, D.C. et JAHOR, F. 1994. Glutamine kinetics in burn patients. *Arch. Surg.* **Vol. 129**: pp. 1318-1323.
- GORE, D.C. et JAHOR, F. 2000. Deficiency in peripheral glutamine production in pediatric patients with burns. *J Burn Care Rehabil.* **Vol. 21**: pp. 172-177.

GORIS, R.J.A. 1996. MODS/SIRS: Result of a overwhelming inflammatory response? *World J. Surg.* **Vol. 20:** pp. 418-421.

GOTTSCHLICH, M.M. et ALEXANDER, J.W. 1987. Fat kinetics and recommended dietary intake in burns. *JPEN. J. Parent. Ent. Nutr.* **Vol. 11(1):** pp. 80-85.

GRANT, J.P. et SNYDER, P.J. 1988. Use of L-glutamine in total parenteral nutrition. *J. Surg. Res.* **Vol. 44(5):** pp. 506-513.

GRIFFITHS, M. et KEAST, D. 1990. The effect of glutamine on murine splenic leukocyte responses to T and B cell mitogens. *Immunol. Cell. Biol.* **Vol. 68:** pp. 405-408.

GRIFFITHS, R.D., JONES, C. et PALMER, T.E. 1997. Six-month outcome of critically ill patients given glutamine-supplemented parenteral nutrition. *Nutrition.* **Vol. 13(4):** pp. 295-302.

GRISWOLD, J.A. 1993. White blood cell response to burn injury. *Sem. Nephrol.* **Vol. 13(4):** pp. 409-415.

GROUX, H., BIGLER, M., DEVRIES, J.E. et RONCAROLO, M.-G. 1996. Interleukin-10 induced a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* **Vol. 184:** pp. 19-29.

<http://www.lcgeurope.com>

HAENEY, M.R. 1998. The role of the complement cascade in sepsis. *J. Antimicrob. Chem.* **Vol. 41(suppl. A):** pp. 41-46.

HAILMAN, E., LICHENSTEIN, H.S., WURFEL, M.M., MILLER, D.S., JOHNSON, D.A., KELEY, M., BUSSE, L.A., ZUKOWSKI, M.M. et WRIGHT, S.D. 1994. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J. Exp. Med.* **Vol. 179(1):** pp. 269-277.

HAMMARQVIST, F., WERNERMAN, J., VON DER DECKEN, A.R. et VINNARS, E. 1989. Addition of glutamine to total parenteral nutrition after elective abdominal surgery spares free glutamine in muscle, counteracts the fall in muscle protein synthesis, and improves nitrogen balance. *Ann. Surg.* **Vol. 209(4):** pp. 455-461.

HAUSSINGER, D. 1986. Regulation of hepatic ammonia metabolism: the intercellular glutamine cycle. *Adv. Enzyme Regul.* **Vol. 25:** pp. 159-180.

HEIDEMAN, M. et BENGTSSON, A. 1992. The immunologic response to thermal injury. *World J. Surg.* **Vol. 16:** pp. 53-56.

HENTZEN, E.R., NEELAMEGHAM, S., KANSAS, G.S., BENATI, J.A., MCINTIRE, L.V., SMITH, C.W. et SIMON, S.I. 2000. Sequential binding of CD11a/CD18 and CD11b/CD18 defines neutrophil capture and stable adhesion to intercellular adhesion molecule-1. *Blood*. Vol. 95(3): pp. 911-920.

HERNDON, D.N., NGUYEN, T.T., WOLFE, R.R., MAGGI S.P., BIOLOG, G., MULLER, M. et BARROW, R.E. 1994. Lipolysis in burned patients is stimulated by the beta 2-receptor for catecholamines. *Arch. Surg.* Vol. 129(12): pp. 1301-1304.

HETHERINGTON, C.J., KINGSLEY, P.D., CROCICCHIO, F., ZHANG, P., RABIN, M.S., PALIS, J. et ZHANG, D.-E. 1999. Characterization of human endotoxin lipopolysaccharide receptor CD14 expression in transgenic mice. *J. Immunol.* Vol. 162: pp. 503-509.

HÖRIG, H., SPAGNOLI, G.C., FILGUEIRA, L., BABST, R., GALLATI, H., HARDER, F., JURETIC, A. et HEBERER, M. 1993. Exogenous glutamine requirement in confined to late events of T cell activation. *J. Cell. Biol.* Vol. 53: pp. 343-351.

HOUDIJK, A.P.J., RIJNSBURGER, E.R., JANSEN, J., WESDORP, R.I.C., WEISS, J.K., MCCAMISH, M.A., TEERLINK, T., MEUWISSEN, S.G.M., HAARMAN, H.J.T.H.M., THUIS, L.G. et VAN LEEUWEN, P.A.M. 1998. Randomised trial of glutamine-enriched enteral nutrition on infectious morbidity in patients with multiple trauma. *Lancet*. Vol. 352: pp. 772-776.

HUGLI, T.E. 1984. Structure and function of the anaphylatoxins. *Springer Semin. Immunopathol.* Vol. 7(2-3): pp. 193-219.

HUIZINGA, T.W., KERST, M., NUYENS, J.H., VLUG, A., VON DER BORNE, A.E., ROOS, D. et TETTEROO, P.A. 1989. Binding characteristics of dimeric IgG subclass complexes to human neutrophils. *J. Immunol.* Vol. 142(7): pp. 2359-2364.

HWANG, D. 1989. Essential fatty acids and immune responses. *FASEB J.* Vol. 3: pp. 2052-2061.

JANEWAY, C.A.Jr., CARDING, S., JONES, B., MURRAY, J., PORTOLES, P., RASMUSSEN, R., ROJO, J., SAIZAWA, K., WEST, J. et BOTTOMLY, K. 1988. CD4+ T cells: specificity and function. *Immunol. Rev.* Vol. 101: pp. 39-80.

JANEWAY, C.A. Jr. 1992. The T cell receptor as a multicomponent signaling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* Vol. 10: pp. 645-674.

JANEWAY, C. 1997. Immunobiologie. Éditions De Boeck Université, Paris.

JEEVANANDAM, M., RAMIAS, L., SHAMOS, R.F. et SCHILLER, W.R. 1992. Decreased growth hormone levels in the catabolic phase of severe injury. *Surgery*. Vol. 111(1): pp. 495-502.

JEFFRIES, M.K. et VANCE, M.L. 1992. Growth hormone and cortisol secretion in patients with burn injury. *J. Burn. Care Rehabil.* **Vol. 13(40)**: pp. 391-395.

JEPSON, M.M., BATES, P.C., BROADBENT, P., PELL, J.M. et MILLWARD, D.J. 1988. Relationship between glutamine concentration and protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* **Vol. 255(2 Pt 1)**: pp. E166-E172.

JOBIN, N., GARREL, D.R. et BERNIER, J. 2000. Increased burn-induced immunosuppression in lipopolysaccharide-resistant mice. *Cell. Immun.* **Vol. 200**: pp. 65-75.

JOBIN, N., GARREL, D. et BERNIER, J. 2000b. Increased serum-soluble interleukine-2 receptor in burn patients: characterization and effects on the immune system. *Human Immunol.* **Vol. 61**: pp.233-246.

JOBIN, N., GARREL, D.R., CHAMPOUX, J. et BERNIER, J. 2000a. Improved immune functions with administration of a low-fat diet in a burn animal model. *Cell. Immunol.* **Vol. 206**: pp. 71-84.

KAN, B., LONDON, I.M. et LEVIN, D.H. 1988. Role of reversing factor in the inhibition of protein synthesis initiation by oxidized glutathione. *J. Biol. Chem.* **Vol. 263(30)**: pp. 15652-15656.

KAPPES, D.J., ALARCON, B. et REGUEIRO, J.R. 1995. T lymphocyte receptor deficiencies. *curr. Opin. Immunol.* **Vol. 7(4)**: pp. 441-447.

KINNEY, J.M., DUKE, J.H. Jr, LONG, C.L. et GUMP, F.E. 1970. Tissue fuel weight loss after injury. *J. Clin. Pathol. Suppl (R. Coll. Pathol.)* **Vol. 4**: pp. 65-72.

KLEIN, G.L., NICOLAI, M., LANGMAN, C.B., CUNEO, B.F., SAILER, D.E. et HERNDON, D.N. 1997. Dysregulation of calcium homeostasis after severe burn injury in children: possible role of magnesium depletion. *J. Pediatr.* **Vol. 131(2)**: pp. 246-251.

KLIMBERG, V.S. et SOUBA, W.W. 1990. The importance of intestinal glutamine metabolism in maintaining a healthy gastrointestinal tract and supporting the body's response to injury and illness. *Surg. Annu.* **Vol. 22**: pp. 61-76.

KOCHER, M., SIEGEL, M.E., EDBERG, J.C. et KIMBERLY, R.P. 1997. Cross-linking of Fc γ receptor IIa and Fc γ receptor IIIb induces different proadhesive phenotypes on human neutrophils. *J. Immunol.* **Vol. 159**: pp. 3940-3948.

KRUISBEEK, A.M., MOND, J.J., FOWLKES, B.J., CARMEN, J.A., BRIDGES, S. et LONGO, D.L. 1985. Absence of the Lyt-2, L3T4+ lineage of T cells in mice treated neonatally with anti-I-A correlates with absence of intrathymic I-A-bearing antigen-presenting cell function. *J. Exp. Med.* **Vol. 161(5)**: pp. 1029-1047.

- KRUTZFELDT, A., SPAHR, R., MERTENS, S., SIEGMUND, B. et PIPER, H.M. 1990. Metabolism of exogenous substrates by coronary endothelial cells in culture. *J. Mol. Cell. Cardiol.* Vol. 22(12): pp. 1393-1404.
- KUDSK, K.A., CROCE, M.A., FABIAN, T.C., MINARD, G. TOLLEY, E.A., PORET, A., KUHL, M.R. et BROWN, R.O. 1992. Enteral versus parenteral feeding. Effects on septic morbidity after blunt and penetrating abdominal trauma. *Ann. Surg.* Vol. 215: pp. 503-513.
- LABOW, B.I. et SOUBA, W.W. 2000. Glutamine. *World J. Surg.* Vol. 24: pp. 1503-1513.
- LARSSON, J., LENNMARKEN, C., MARTENSSON, J., SANDSTEDT, S. et VINNARS, E. 1990. Nitrogen requirements in severely injured patients. *Br. J. Surg.* Vol. 77(4) : pp. 413-416.
- LARSSON, S. et LINDEN, M. 1998. Effects of a corticosteroid, budesonide, on production of bioactive IL-12 by human monocytes. *Cytokine.* Vol. 10(10): pp. 786-789.
- LAZO, P.A. 1981. Amino acids and glucose utilization by different metabolic pathways in ascites-tumour cells. *Eur. J. Biochem.* Vol. 117(1): pp. 19-25.
- LE BOUCHER, J. et CYNOBER, L. 1997. Protein metabolism and therapy in burn injury. *Ann. Nutr. Metab.* Vol 41: pp. 69-82.
- LE BOUCHER, J., COUDRAY-LUCAS, C., LASNIER, E., JARDEL, A., EKINDJIAN, O.G. et CYNOBER, L.A. 1997. Enteral administration of ornithine α -ketoglutarate or arginine α -ketoglutarate: A comparative study of their effects on glutamine pools in burn-injured rats. *Crit. Care Med.* Vol. 25(2): pp. 293-298.
- LE BOUCHER, J., FARGES, M.-C., MINET, R., VASSON, M.-P. et CYNOBER, L. 1999. Modulation of immune response with ornithine α -ketoglutarate in burn injury: An arginine or glutamine dependency? *Bas. Nutr. Invest.* Vol. 15(10): pp. 773-777.
- LITTLE, R.J.A. et DUBIN, D.B. 1987. Statistical analysis with missing data, John Wiley & Sons. (ISBN 0-471-80243-9)
- LOCNISKAR, M., NAUSS, K.M. et NEWBERNE, P.M. 1983. The effect of quality and quantity of dietary fat on the immune system. *J. Nutr.* Vol. 113: pp. 951-961.
- LUO, J.L., HAMMARQVIST, F., ANDERSSON, K. et WERNERMAN, J. 1998. Surgical trauma decrease glutathione synthetic capacity in human skeletal muscle tissue. *Am. J. Physiol.* Vol. 275(2 Pt 1): pp. E359-E365.
- LYNCH, R.G. 2000. Regulatory roles for Fc γ RIII (CD16) and Fc γ RII (CD32) in the development of T- and B-lineage lymphoid cells. *J. Leukoc. Biol.* Vol. 67: pp. 279-284.

- MARES-PERLMAN, J.A. et SHRAGO, E. 1988. Energy substrate utilization in freshly isolated Morris hepatoma 7777 cells. *Cancer Res.* **Vol. 48(3)**: pp. 602-608.
- MATES, J.M., PEREZ-GOMEZ, C., DECASTRO, I.N., ASENJO, M. et MARQUEZ, J. 2002. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **Vol. 34(5)**: pp. 439-458.
- MATSUSHITA, S. et NISHIMURA, Y. 1997. Partial activation of human T cells by peptide analogs on live APC : Induction of clonal anergy associated with protein tyrosine dephosphorylation. *Hum. Immunol.* **Vol. 53**: pp. 73-80.
- MATSUO, R., KOBAYASHI, M., HERNDON, D.N., POLLARD, R.B. et SUZUKI, F. 1996. Interleukin-12 protects thermally injured mice from herpes simplex virus type 1 infection. *J. Leukoc. Biol.* **Vol. 59(5)**: pp. 623-630.
- MEGUID, M.M., SCHIMMEL, E., JOHNSON, W.C., MEGUID, V., LOWELL, B.C., BOURINSKI, J. et NABSETH, D.C. 1982. Reduced metabolic complications in total parenteral nutrition: pilot study using fat to replace one-third of glucose calories. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* **Vol. 6(4)**: pp. 304-307.
- MEISTER, A. et ANDERSON, M.E. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **Vol. 52**: pp. 711-760.
- MENDONCA, R.Z., ARROZIO, S.J., ANTONIAZZI, M.M., FERREIRA, J.M. et PEREIRA, C.A. 2002. Metabolic active-high density VERO cell cultures on microcarriers following apoptosis prevention by galactose/glutamine feeding. *J. Biotechnol.* **Vol. 97(1)**: pp. 13-22.
- MILLER, S.F., FINLEY, R.K., WATMAN, M. et LINCKS, J. 1991. Burn size estimate reliability: a study. *J. Burn Care Rehabil.* **Vol. 12(6)**: pp. 546-59.
- MILLER-GRAZIANO, C.L., FINK, M., WU, J.Y., SZABO, G. et KODYS, K. 1988. Mechanisms of altered monocyte prostaglandine E₂ production in severely injured patients. *Arch. Surg.* **Vol. 123**: pp. 293-299.
- MOCHIZUKI, H., TROCKI, O., DOMINIONI, L., RAY M.B. et ALEXANDER, J.W. 1984. Optimal lipid content for enteral diets following thermal injury. *J. Parent. Ent. Nutr.* **Vol. 8(6)**: pp. 638-646.
- NAGARAJAN, S., CHESLA, S., COBERN, L., ANDERSON, P., ZHU, C. et SELVARAJ, P. 1995. Ligand binding and phagocytosis by CD16 (Fc γ Receptor III) isoforms. *J. Biol. Chem.* **Vol. 270(43)**: pp. 25762-25770.
- NEWSHOLME, E.A. 1996. The possible role of glutamine in some cells of the immune sytem and the possible consequence for the whole animal. *Experientia.* **Vol. 52**: pp. 455-459.

- NGUYEN, T.T., GILPIN, D.A., MEYER, N.A. et HERNDON, D.N. 1996. Current treatment of severely burned patients. *Ann. Surg.* Vol. 223(1): pp. 14-25.
- NISSIM, I., YUDKOFF, M. et SEGAL, S. 1985. Metabolism of glutamine end glutamate by rat renal tubules. Study with ^{15}N and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* Vol. 260(26): pp. 13955-13967.
- NORDENSTROM, J., ASKANAZI, J., ELWYN, D.H., MARTIN, P., CARPENTIER, Y.A., ROBIN, A.P. et KINNEY, J.M. 1983. Nitrogen balance during total parenteral nutrition: glucose vs. fat. *Ann. Surg.* Vol. 197(1): pp. 27-33.
- O'DWYER, S.T., SMITH, R.J., HWANG, T.L. et WILMORE, D.W. 1989. Maintenance of small bowel mucosa with glutamine-enriched parenteral nutrition. *J. Parent. Ent. Nutr.* Vol. 13(6): pp. 579-585.
- OGLE, C.K., ALEXANDER, J.W., NAGY, H., WOOD, S., PALKERT, D., CAREY, M., OGLE, J.D. et WARDEN, G.D. 1990. A long-term study and correlation of lymphocyte and neutrophil function in the patient with burns. *J. Burn Care Rehabil.* Vol. 11 : pp. 105-111.
- OGLE, C.K., OGLE, J.D., MAO, J.X., SIMON, J., NOEL, J.G., LI, B.G. et ALEXANDER, J.W. 1994. Effect of glutamine on phagocytosis and bacterial killing by normal and pediatric burn patient neutrophils. *J. Parent. Ent. Nutr.* Vol. 18(2): pp. 128-133.
- O'MAHONY, J.B., WOOD, J.J., RODRICK, M.L. et MANNICK, J.A. 1985. Changes in T lymphocyte subsets following injury. Assessment by flow cytometry and relationship to sepsis. *Ann. Surg.* Vol. 202(5): pp. 580-586.
- ORGAN, B.C., ANTONACCI, A.C., CHIAO, J., KUMAR, A., RIESTHAL, H.F., YUAN, L., BLACK, D. et CALVANO, S.E. 1989. Changes in lymphocyte numbers and phenotype in seven lymphoid compartment after thermal injury. *Ann. Surg.* Vol. 210(1): pp. 78-89.
- O'SULLIVAN, S.T., O'CONNOR, T.P.F., 1997. Immunosuppression following thermal injury : the pathogenesis of immunodysfunction. *Br. J. Plast. Surg.* Vol. 50: pp. 615-623.
- PACHECO-CASTRO, A., ALVAREZ-ZAPATA, D., SERRANO-TORRES, P. et REGUEIRO, J.R. 1998. Signaling through a CD3 γ -deficient TCR/CD3 complex in immortalized mature CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.* Vol. 161: pp. 3152-3160.
- PARIJS, L.V. et ABBAS, A.K. 1998. Homeostasis and self-tolerance in the immune system : turning lymphocytes off. *Science.* Vol. 280: pp. 243-248.

- PARRY-BILLINGS, M., EVANS, J., CALDER, P.C. et NEWSHOLME, E.A. 1990. Does glutamine contribute to immunosuppression after burns? *Lancet* **Vol. 336**: pp. 523-525.
- PLYMATE, S.R., VAUGHAN, G.M., MASON, A.D. et PRUITT, B.A. 1987. Central hypogonadism in burned men. *Horm. Res.* **Vol. 27(3)**: pp. 152-158.
- POLLACK, S.V. 1979. Wound healing; a review. III. Nutritional factors affecting wound healing. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* **Vol. 5(8)**: pp. 615-619.
- ROSS, G.D. et VĚTVIČKA, V. 1993. CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand binding and functions. *Clin. Exp. Immunol.* **Vol. 92**: pp. 181-184.
- ROTH, E., OEHLER, R., MANHART, N., EXNER, R., WESSNER, B., STRASSER, E. et SPITTLER, A. 2002. Regulative potential of glutamine---relation to glutathion metabolism. *Nutrition.* **Vol. 18(3)**: pp. 217-221.
- ROUMEN, R.M., REDL, H., SCHLAG, G., ZILOW, G., SANDTNER, W., KOLLER, W., HENDRIKS, T. et GORIS, R.J. 1995. Inflammatory mediators in relation to the development of multiple organ failure in patients after severe blunt trauma. *Crit. Care Med.* **Vol. 23(3)**: pp. 474-480.
- ROUZER, C.A., SCOTT, W.A., HAMILL, A.L., LIU, F.T., KATZ, D.H. et COHN, Z.A. 1982. Secretion of leukotriene C and other arachidonic acid metabolites by macrophages challenged with immunoglobulin E immune complexes. *J. Exp. Med.* **Vol. 156(4)**: pp. 1077-1086.
- SAITO, H., TROCKI, O., WANG, S., GONCE, S.J., JOFFE, S.N. et ALEXANDER, J.W. 1987. Metabolic and immune effects of dietary arginine supplementation after burn. *Arch. Surg.* **Vol. 122**: pp. 784-789.
- SALLOUM, R.M., SOUBA, W.W., KLIMBERG, V.S., PLUMLEY, D.A., DOLSON, D.J., BLAND, K.I. et COPELAND, E.M. 1989. Glutamine is superior to glutamate in supporting gut metabolism, stimulating intestinal glutaminase activity and preventing bacterial translocation. *Surg. Forum.* **Vol. 40**: pp. 6-8.
- SALLOUM, R.M., SOUBA, W.W., FERNANDEZ, A. et STEVENS, B.R. 1990. Dietary modulation of small intestinal glutamine transport in intestinal brush border membrane vesicles of rats. *J. Surg. Res.* **Vol. 48(6)**: pp. 635-638.
- SALTER, R.D., NORMENT, A.M., CHEN, B.P., CLAYBERGER, C., KRENSKY, A.M., LITTMAN, D.R. et PARHAM, P. 1989. Polymorphism in the alpha 3 domain of HLA-A molecules affects binding to CD8. *Nature.* **Vol. 338(6213)**: pp. 345-347.

SATO, S., STEEBER, D.A., JANSEN, P.J. et TEDDER, T.F. 1997. CD19 expression levels regulate b lymphocyte development: human CD19 restore normal function in mice lacking endogenous CD19. *J. Immunol.* **Vol. 158**: pp. 4662-4669.

SCHIFF, D.E., RAE, J., MARTIN, T.R., DAVIS, B.H. et CURNUTTE, J.T. 1997. Increased phagocyte Fc γ RI expression and improved Fc γ -receptor-mediated phagocytosis after in vivo recombinant human interferon- γ treatment of normal human subjects. *Blood.* **Vol. 8(15)**: pp. 3187-3194.

SCHLOERB, P.R. et AMARE, M. 1993. Total parenteral nutrition with glutamine in bone marrow transplantation and other clinical applications (a randomized, double-blind study). *J. Parent. Ent. Nutr.* **Vol. 17(5)**: pp. 407-413.

SCHWACHA, M.G., ANANTHA SAMY, T.S., CATANIA, R.A. et CHAUDRY, I.H. 1998. Thermal injury alters macrophage responses to prostaglandine E₂ : contribution to the enhancement of inducible nitric oxide synthase activity. *J. Leukoc. Biol.* **Vol. 64**: pp. 740-746.

SHALEKOFF, S., PAGE-SHIPPI, L. et TIEMESSEN, C.T. 1998. Effects of anticoagulants and temperature on expression of activation markers CD11b and HLA-DR on human leukocytes. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **Vol. 5(5)**: pp. 695-702.

SHAPIRO, H.M. 2000. Membrane potential estimation by flow cytometry. *Methods.* **Vol. 21(3)**: pp. 271-279.

SIMMONS, D.L., TAN, S., TENEN, D.G., NICHOLSON-WELLER, A. et SEED, B. 1989. Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood.* **Vol. 73(1)**: pp. 284-289.

SMITH, A., BARCLAY, C., QUABA, A., SEDOWOFIA, K., STEPHEN, R., THOMPSON, M., WATSON, A. Et MCINTOSH, N. 1997. The bigger the burn, the greater the stress. *Burns.* **Vol. 23(4)**: pp. 291-294.

SOUBA, W.W. 1987. Interorgan ammonia metabolism in health and disease: a surgeon's view. *J. Parent. Ent. Nutr.* **Vol. 11(6)**: pp. 569-579.

SPITTLER, A., WINKLER, S., GÖTZINGER, P., OEHLER, R., WILLHEIM, M., TEMPFER, C., WEIGEL, G., FÜGGER, R., BOLTZ-NITULESCU, G. et ROTH, E. 1995. Influence of glutamine on the phenotype and function of human monocytes. *Blood.* **Vol. 86(4)**: pp. 1564-1569.

SPOLARICS, Z., LANG, C.H., BAGBY, G.J. et SPITZER, J.J. 1991. Glutamine and fatty acid oxidation are the main sources of energy for Kupffer and endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **Vol. 261(2 Pt 1)**: pp. G185-G190.

STAAL, F.J., ELA, S.W., ROEDERER, M., ANDERSON, M.T., HERZENBERG, L.A. et HERZENBERG, L.A. 1992. Glutathione deficiency and human immunodeficiency virus infection. *Lancet*. **Vol. 339(8798)**: pp. 909-912.

STEHLE, P., ZANDER, J., MERTES, N., ALBERS, S., PUCHSTEIN, C., LAWIN, P. et FURST, P. 1989. Effect of parenteral glutamine peptide supplements on muscle glutamine loss and nitrogen balance after major surgery. *Lancet*. **Vol. 1(8646)**: pp. 231-233.

SUSSMAN, J.J., BONIFACINO, J.S., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., WEISSMAN, A.M., SAITO, T., KLAUSNER, R.D. et ASHWELL, J.D. 1988. Failure to synthesize the T cell CD3-zeta chain: structure and function of a partial T cell receptor complex. *Cell*. **Vol. 52(1)**: pp. 85-95.

SUTHANTHIRAN, M., ANDERSON, M.E., SHARMA, V.K. et MEISTER, A. 1990. Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal T lymphocytes stimulated via the CD2 and CD3 antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **Vol. 87(9)**: pp. 3343-3347.

TAYLOR, P., BOTTO, M. et WALPORT, M. 1998. The complement system. *Curr. Biol*. **Vol. 8(8)**: pp. R259-R261.

TAUDOOU, G., WIART, J.A. et PANIJEL, J. 1983. Influence of amino acids deficiency and tRNA aminoacylation on DNA polymerase activity during the secondary immune response in vitro. *Mol. Immunol*. **Vol. 20(3)**: pp. 255-261.

TEDDER, T.F., ZHOU, L.-J. et ENGEL, P. 1994. The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol. Today*. **Vol. 15**: pp. 437-442.

TEDDER, T.F., INAOKI, M. et SATO, S. 1997. The CD19-21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity*. **Vol. 6(2)**: pp. 107-118.

TEDDER, T.F. 1998. Introduction: response-regulators of B lymphocyte signaling thresholds provide a context for antigen receptor signaling transduction. *Semin. Immunol*. **Vol. 10(4)**: pp. 259-265.

TREMEL, H., KIENLE, B., WEILEMANN, L.S., STEHLE, P. et FURST, P. 1994. Glutamine dipeptide-supplemented parenteral nutrition maintains intestinal function in the critically ill. *Gastroenterology*. **Vol. 107(6)**: pp. 1595-1601.

TROCKI, O., HEYD, T.J., WAYMACK, J.P. et ALEXANDER, J.W. 1987. Effects of fish oil on postburn metabolism and immunity. *J. Parent. Ent. Nutr.* **Vol. 11(6)**: pp. 521-528.

UTSUNOMIYA, T., KOBAYASHI, M., HERNDON, D.N., POLLARD, R.B. et SUZUKI, F. 2001. A mechanism of interleukin-12 unresponsiveness associated with thermal injury. *J. Surg. Res.* **Vol. 96** : pp. 211-217.

VAN DER HULST, R.R., VAN KREL, B.K., VON MEYENFELDT, M.F., BRUMMER, R.J., ARENDS, J.W., DEUTZ, N.E. et SOETERS, P.B. 1993. Glutamine and the preservation of gut integrity. *Lancet.* **Vol. 341(8857)**: pp. 1363-1365.

VAN DER POUW KRAAN, T.C., BOEIJE, L.C., SMEENK, R.J., WIJDENES, J. Et AARDEN, L.A. 1995. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J. Exp. Med.* **Vol. 181(2)**: pp.775-779.

WALLACE, C. et KEAST, D. 1992. Glutamine and macrophage function. *Metabolism.* **Vol. 41(9)**: pp. 1016-1020.

WAYDHAS, C., NAST-KOLB, D., JOCHUM, M., TRUPKA, A., LENK, S., FRITZ, H., DUSWALD, K.H. et SCHWEIBERER, L. 1992. Inflammatory mediators, infection, sepsis, and multiple organ failure after severe trauma. *Arch. Surg.* **Vol. 127(4)**: pp. 460-467.

WAYMACK, J.P., JENKINS, M.E., ALEXANDER, J.W., WARDEN, G.D., MILLER, A.C., CAREY, M., OGLE, C.K. et KOPCHA, R.G. 1989. A prospective trial of prophylactic intravenous immune globulin for the prevention of infections in severely burned patients. *Burn.* **Vol. 15(2)**: pp. 71-76.

WEISS, A. et LITTMAN, D.R. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell.* **Vol. 76(2)**: pp. 263-274.

WEISS, M., MOLDAWER, L.L. et SCHNEIDER, E.M. 1999. Granulocyte colony-stimulating factor to prevent the progression of systemic nonresponsiveness in systemic inflammatory response syndrome ad sepsis. *Blood.* **Vol. 93(2)**: pp. 425-439.

WILMORE, D.W., CURRERI, P.W., SPITZER, M.E. et PRUITT, B.A.Jr. 1971. Supranormal dietary intake in thermally injured hypermetabolic patients. *Surg. Gynecol. Obstet.* **Vol. 132(5)**: pp. 881-886.

WILMORE, D.W., LINDSEY, C.A., MOYLAND, J.A., FALOONA, G.R., PRUITT, B.A. et UNGER, R.H. 1974. Hyperglucagonaemia after burns. *Lancet.* **Vol. 1(7847)**: pp. 73-75.

WILMORE, D.W., LONG, J.M., MASON, A.D. Jr., SKREEN, R.W. et PRUITT, B.A. Jr. 1974. Catecholamines: mediator of the hypermetabolic response to thermal injury. *Ann. Surg.* **Vol. 180(4)**: pp. 653-669.

WILMORE, D.W. 2001. The effect of glutamine supplementation in patients following elective surgery and accidental injury. *J. Nutr.* **Vol. 131**: pp. 2543S-2549S.

WISCHMEYER, P.E., LYNCH, J., LIEDEL, J., WOLFSON, R., RIEHM, J., GOTTLIEB, L. et KAHANA, M. 2001. Glutamine administration reduces Gram-negative bacteremia in severely burned patients: A prospective, randomized, double-blind trial versus isonitrogenous control. *Crit. Care Med.* Vol. **29(11)**: pp. 2075-2080.

WOLFE, R.R., DURKOT, M.J., ALLSOP, J.R. et BURKE, J.F. 1979. Glucose metabolism in severely burned patients. *Metabolism.* Vol. **28(10)**: pp. 1031-1039.

WOLFE, R.R., HERNDON, D.N., JAHOOOR, F., MIYOSHI, H. et WOLFE, M. 1987. Effect of severe burn injury on substrate cycling by glucose and fatty acids. *N. Eng. J. Med.* Vol. **317(7)**: pp. 403-408.

WOLFE, R. R., 1996. Herman award lecture, 1996: relation of metabolic studies to clinical nutrition – the example of burn injury. *Am. J. Clin. Nutr.* Vol. **64**: pp. 800-808.

WOOD, J.J., RODRICK, M.L., O'MAHONY, J.B., PALDER, S.B., SAPOROSCHETZ, I., D'EON, P. et MANNICK, J.A. 1984. Inadequate interleukine 2 production. A fundamental immunological deficiency in patients with major burns. *Ann. Surg.* Vol. **200(3)**: pp. 311-320.

WU, C.Y., WANG, K., MCDYER, J.F. et SEDER, R.A. 1998. Prostaglandin E2 and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. *J. Immunol.* Vol. **161(6)**: pp. 2723-2730.

YANG, L. ET HSU, B. 1992. The roles of macrophage (M phi) and PGE-2 in postburn immunosuppression. *Burns.* Vol. **18(2)**: pp. 132-136.

YURT, R.W. et PRUITT, B.A. Jr. 1986. Base-line and postthermal injury plasma histamine in rats. *J. Appl. Physiol.* Vol. **60(5)**: pp. 1782-1788.

ZAPATA-SIRVENT, R.L., HANSBROUGH, J.F., OHARA, M.M., RICE-ASARO, M. et NYHAN, W.L. 1994. Bacterial translocation in burned mice after administration of various diets including fiber- and glutamine-enriched enteral formulas. *Crit. Care Med.* Vol. **22(4)**: pp. 690-696.

ZIEGLER, T.R., YOUNG, L.S., BENFELL, K., SCHELTINGA, M., HORTOS, K., BYE, R., MORROW, F.D., viable lymphocytes by means of fluorescence intensity and polarization. JACOBS, D.O., SMITH, R.J., ANTIN, J.H. et al. 1992. Clinical and metabolic efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition after bone marrow transplantation. A randomized, double-blind, controlled study. *Ann. Intern. Med.* Vol. **116(10)**: pp. 821-828.

ZIEGLER, T.R. et YOUNG, L.S. 1997. Therapeutic effects of specific nutrients. Dans: ROMBEAU, J.L., ROLADELLI, R.H. editeurs. *Clinical nutrition: Enteral and tube feeding*, 3^{ième} ed. pp. 112-138. WB Saunders, Philadelphie.

ZIEGLER-HEITBROCK, H.W. et ULEVITCH, R.J. 1993. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol. Today.* Vol. **14(3)**: pp. 121-125.

ZORATTI, M. et SZABO, I. 1995. The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta.* Vol. 1241: pp. 139-176.

ZURGIL, N., KAUFMAN, M., SOLODIEV, I. et DEUTSCH, M. 1999. Determination of cellular thiol levels in individual viable lymphocytes by means of fluorescence intensity and polarization. *J. Immunol. Methods.* Vol. 229(1-2): 23-34.