



**HAL**  
open science

**Zinc et brûlure : Etude du statut en zinc et de l'influence de la supplémentation sur un modèle animal de brûlure sévère. Approche métabolique et moléculaire.**

Richard Claeysen

► **To cite this version:**

Richard Claeysen. Zinc et brûlure : Etude du statut en zinc et de l'influence de la supplémentation sur un modèle animal de brûlure sévère. Approche métabolique et moléculaire.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00453943

**HAL Id: tel-00453943**

**<https://theses.hal.science/tel-00453943>**

Submitted on 6 Feb 2010

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE L'UNIVERSITE DE GRENOBLE – Joseph FOURIER**

ECOLE DOCTORALE EN INGENIERIE POUR LA SANTE,  
LA COGNITION ET L'ENVIRONNEMENT

**DIPLOME DE DOCTORAT**

soutenue publiquement le 30 novembre 2009

par

**Richard CLAEYSSEN**

**Zinc et brûlure :  
Etude du statut en zinc et de l'influence de la supplémentation  
sur un modèle animal de brûlure sévère.  
Approche métabolique et moléculaire.**

Thèse dirigée par le Pr. Anne-Marie ROUSSEL et le Dr. Yves CHANCERELLE

Jury :

Mme le Docteur Isabelle HININGER-FAVIER

Mme le Professeur Mette BERGER

Mme le Docteur Muriel BOST

M. le Docteur Xavier FORCEVILLE

M. le Pharmacien Chef des Services Yves CHANCERELLE

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Codirecteur de thèse

Thèse préparée au :

Centre de Recherches du Service de Santé des Armées – CRSSA, en collaboration avec  
l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale – INSERM U884 (Laboratoire de  
Bioénergétique Fondamentale et Appliquée).









*« La vie n'est facile pour personne. Et alors ?  
Il faut faire preuve de persévérance et surtout de confiance en soi.  
Il faut être convaincu qu'on est doué pour quelque chose et que cette chose,  
quel qu'en soit le prix, doit être atteinte. »*

*Marie CURIE*



## **Remerciements**

### *Aux membres du jury,*

Madame le Docteur Isabelle HININGER-FAVIER pour avoir accepté la présidence de ce jury,

Madame le Professeur Mette BERGER et Madame le Docteur Muriel BOST pour avoir accepté d'en être les rapporteurs,

Monsieur le Docteur Xavier FORCEVILLE pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je suis très sensible à l'honneur qu'ils me font d'accorder une partie de leur temps afin de juger ce travail. Qu'ils veuillent bien trouver ici l'expression de ma respectueuse considération.

### *Aux co-directeurs de thèse,*

Madame le Professeur Anne-Marie ROUSSEL pour m'avoir témoigné sa confiance, pour m'avoir conseillé, guidé et encouragé. Sa patience et sa disponibilité m'honorent. Qu'elle veuille bien recevoir ici l'expression de mon profond respect.

Monsieur le Pharmacien Chef des Services Classe Normale Yves CHANCERELLE pour m'avoir accueilli au sein du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées. Il a mis à ma disposition ses compétences ainsi que les moyens techniques et humains nécessaires à la réalisation de cette thèse. Qu'il en soit aujourd'hui vivement remercié.

### *Aux encadrants et aux techniciens,*

Madame le Vétérinaire en Chef Diane AGAY pour avoir géré ce projet. Sa supervision des expérimentations et de la rédaction des articles, ses conseils, sa rigueur et sa patience furent d'une aide indéniable. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Madame le Docteur Maud ANDRIOLLO-SANCHEZ pour avoir participé, tous les jours pendant deux ans, à la genèse de ce projet. Son implication, sa compétence, sa gentillesse et son sourire furent de précieux alliés. Qu'elle en soit aujourd'hui très chaleureusement remerciée.

Monsieur le Médecin en Chef André PEINNEQUIN pour la formation et la mise en place des expérimentations en biologie moléculaire.

Josiane DENIS du Laboratoire d'Analyses Biologiques du CRSSA pour les dosages sanguins et enzymatiques. Sa disponibilité, sa rigueur et sa sympathie l'honorent.

Josiane ARNAUD et à son équipe du Département de Biologie Intégré de l'hôpital Michalon (Dominique BLONDELLE et Marie-Christine BOUILLET) pour le dosage des éléments-trace.

Laurence TOUVARD pour les coups de mains lors des expérimentations et des broyages d'organes.

Mireille OSMAN et Anne AUBOURG du laboratoire de Nutrition Vieillessement et Maladies Cardiovasculaires pour l'apprentissage des techniques de dosages enzymatiques.

L'ensemble de l'équipe de Biologie Appliquée du CRSSA qui a pris soin des animaux et qui a toujours su répondre « présent » lors des soucis de dernières minutes ou des manipulations lors des week-ends.

Je tiens à remercier tous ceux qui m'ont soutenu par leur amitié inestimable ou leur affection :

J'adresse un grand merci aux compagnons de galère du « caso » qui m'ont accordé leur sympathie : Virginie, Loubna, Charlotte, Chloé, Eugénie, Aurore, Sébastien, Philippe. Leur joie de vivre et leur amitié ont été un réel soutien et m'ont permis de m'évader lors des moments difficiles.

Céline (mention spéciale pour la relecture du pavé !), Christophe, Jean-François, Laure, Thomas, Patrick, Stéphane, Bruno, Alexandre, Florian, Aurélie, Jean-Baptiste, Jérôme, Pascal, Mylène, Florent, Mélanie, Vanessa pour leur gentillesse, leur bonne humeur et pour tous les bons moments passés ensemble. J'espère qu'il y en aura d'autres...

Mon frère Bertrand pour m'avoir protégé depuis toujours et pour la patience dont il fait preuve depuis vingt-neuf ans.

Ma grand-mère qui aurait été fière de son petit-fils.

Enfin et par-dessus tout, mes Parents, pour m'avoir encouragé, soutenu et fait confiance même durant certains moments pénibles. Qu'ils trouvent ici le témoignage de tout l'amour que je leur porte.

# **Sommaire**



<b>Table des Illustrations.....</b>	<b>7</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>9</b>
<b>Etude bibliographique</b>	
<b>Première partie : Les brûlures .....</b>	<b>13</b>
<b>1. Epidémiologie.....</b>	<b>17</b>
<b>2. Etiologie .....</b>	<b>18</b>
<b>3. Evaluation de l'importance des lésions .....</b>	<b>20</b>
3.1. Evaluation de la surface brûlée .....	20
3.2. Profondeur de la brûlure .....	22
3.3. Localisations et facteurs aggravants l'évolution clinique des brûlures .....	25
<b>Etude bibliographique</b>	
<b>Deuxième partie : Intérêt biologique du zinc chez les grands brûlés .</b>	<b>27</b>
<b>1. Zinc et physiopathologie .....</b>	<b>29</b>
1.1. Zinc et stress oxydant .....	30
1.1.1. Rappel sur le stress oxydant .....	30
1.1.1.1. Les radicaux libres .....	31
1.1.1.2. Les systèmes antioxydants .....	31
1.1.1.3. Stress oxydant et brûlure .....	32
1.1.2. Propriétés antioxydantes du zinc .....	35
1.1.3. Carence en zinc et stress oxydant .....	35
1.1.4. Apports nutritionnels et stress oxydant .....	38
1.2. Zinc et insuline .....	45
1.2.1. Relations entre le zinc et l'insuline .....	45
1.2.2. Carence en zinc et insulino-résistance .....	47
1.2.3. L'insulino-résistance : Une hypothèse de développement de stress oxydant. ....	49
1.2.3.1. Augmentation de la voie des polyols .....	49
1.2.3.2. Glycation des protéines .....	51
1.2.3.3. Production mitochondriale d'anions superoxydes .....	51
1.2.4. Apports nutritionnels et insulino-résistance .....	52



1.3.	Zinc et immunité _____	53
1.3.1.	Implications du zinc dans le système immunitaire _____	53
1.3.2.	Carence en zinc et système immunitaire _____	54
1.3.3.	Apports nutritionnels et système immunitaire _____	55
<b>2.</b>	<b>Brûlure et altération du statut en zinc.....</b>	<b>60</b>
2.1.	Evolution des micronutriments chez les grands brûlés _____	60
2.1.1.	Déficits en micronutriments chez le grand brûlé _____	60
2.1.2.	Statut en zinc des grands brûlés _____	63
2.2.	Homéostasie cellulaire du zinc _____	67
2.2.1.	Exportation du zinc cellulaire : La famille des ZnTs _____	68
2.2.2.	Importation du zinc cellulaire : La famille Zip _____	73
2.2.3.	Les métallothionéines _____	76
2.2.3.1.	Synthèse _____	77
2.2.3.2.	Fonctions physiologiques des métallothionéines _____	79
2.3.	Intérêts de la correction des déficits par un apport thérapeutique _____	82
2.4.	Problèmes posés par la supplémentation _____	87
2.4.1.	Apports induisant une toxicité _____	87
2.4.1.1.	Toxicité aiguë _____	87
2.4.1.2.	Toxicité chronique _____	89
2.4.2.	Apports à doses pharmacologiques _____	90
2.4.3.	Apports légèrement supérieurs aux apports journaliers recommandés (AJR) _____	91
<b>3.</b>	<b>Objectifs de notre travail .....</b>	<b>93</b>
	<b>Travail expérimental .....</b>	<b>95</b>
<b>1.</b>	<b>Influence du statut en zinc dans la réponse à la brûlure : étude expérimentale sur modèle de rats brûlés sub-déficients en zinc.....</b>	<b>97</b>
1.1.	Protocole _____	97
1.2.	Expérimentation I : Etude cinétique du stress oxydant induit par la brûlure _____	98
1.2.1.	Objectifs _____	98
1.2.2.	Paramètres évalués _____	98
1.2.3.	Principaux résultats _____	99
1.2.3.1.	Carence modérée : effets avant brûlure _____	99
1.2.3.2.	Carence modérée : effets après brûlure _____	100
1.2.4.	Conclusions _____	102
1.2.5.	Perspectives _____	102
1.2.6.	Article « Biological Trace Element Research » _____	102

1.3. Expérimentation II : Insulino-résistance associée à la brûlure et carence en Zn	121
1.3.1. Objectifs	121
1.3.2. Paramètres évalués	121
1.3.3. Principaux résultats	121
1.3.4. Conclusions	123
1.3.5. Article « Biological Trace Element Research »	123

## **2. Intérêt de la supplémentation en zinc après agression thermique** 137

2.1. Expérimentation III : Evaluation de la toxicité de la supplémentation en zinc par voie intrapéritonéale	137
2.1.1. Objectifs	137
2.1.2. Protocole	138
2.1.3. Principaux résultats	138
2.1.4. Conclusions	141
2.1.5. Article « Basic & Clinical pharmacology & toxicology »	141
2.2. Expérimentation IV : Effet de la supplémentation en zinc sur le stress oxydant induit par la brûlure	149
2.2.1. Objectifs	149
2.2.2. Protocole	149
2.2.3. Résultats	150
2.2.4. Conclusions	155
2.2.5. Perspectives	156
2.2.6. Article soumis à « Journal of Biological Trace Element in Medicine & Biology »	157

## **3. Expérimentation V : Effets du statut en Zn sur les changements induits par la brûlure au niveau de la métallothionéine-I et de transporteurs du Zn (ZnT-1, ZnT-4, Zip2, Zip4).** ..... 191

3.1. Objectifs	191
3.2. Protocole	191
3.3. Principaux Résultats	192
3.3.1. Effets de la brûlure	192
3.3.2. Conséquences d'un apport en zinc	193
3.4. Conclusion	194
3.5. Article soumis à « Journal of Nutritional Biochemistry »	195
5.1. Principe de la spectrométrie d'absorption (SAA)	255
5.2. Réalisation des dosages	257

**Discussion - Perspectives..... 225**

**Liste des Annexes..... 233**

**Bibliographie..... 265**

# Liste des Figures

Figure 1 : Règle des « 9 » de Wallace. ....	21
Figure 2 : Table de Lund et Browder.....	21
Figure 3 : Brûlure étendue du dos à l'admission .....	23
Figure 4 : Anatomie de la peau après brûlure au 1 <sup>er</sup> degré et au 2 <sup>ème</sup> degré superficiel .....	24
Figure 5 : Anatomie de la peau après brûlure au 2 <sup>ème</sup> degré profond et brûlure totale au 3 <sup>ème</sup> degré.....	24
Figure 6 : Brûlure de la main.....	25
Figure 7 : Origine des différents radicaux libres oxygénés impliqués en biologie.....	30
Figure 8 : Formation des espèces réactives de l'oxygène, processus de peroxydation lipidique et place des principaux antioxydants dans le management du stress oxydant.....	32
Figure 9 : Cristal d'hexamère d'insuline complexé à deux atomes de Zn. ....	45
Figure 10 : Effet du Zn et du couple redox sur la phosphorylation du récepteur à l'insuline.....	46
Figure 11 : Voie des polyols et autres voies métaboliques induites par l'hyperglycémie. ....	50
Figure 12 : Formation des produits avancés de la glycation (AGE) lors de la glycation des protéines.. ...	51
Figure 13 : Effet du Zn sur l'activation de NFκB dans les cellules HUT-78.....	57
Figure 14 : Inhibition de NFκB par les protéines A20 induites par le Zn dans les cellules HL-60.....	58
Figure 15 : Zn, un agent antioxydant et anti-inflammatoire.....	59
Figure 28 : Origines de la carence en micronutriments chez les patients brûlés. ....	61
Figure 17 : Evolution théorique de la concentration en Zn plasmatique, après brûlure, chez l'Homme. ...	65
Figure 18 : Représentation schématique, fonction et localisation des transporteurs de zinc Zn-T et Zip. .	67
Figure 19 : Topologie du transporteur Zn-T .....	68
Figure 20 : Topologie du transporteur Zip.....	73
Figure 21 : Localisation cellulaire des principaux transporteurs du Zn. ....	76
Figure 22 : Structure des métallothionéines.....	77
Figure 21 : Promoteur de la métallothionéine-I .....	78
Figure 24 : Conséquence d'un déficit en vitamines et éléments-trace en cas de maladie grave.....	85
Figure 25 : Toxicité des composés du zinc .....	88
Figure 26 : Procédure expérimentale de l'étude sur les effets d'une carence en zinc après brûlure .....	97
Figure 27 : Modèle expérimental de subdéficience en zinc.. ....	99
Figure 28 : Evolution des concentrations plasmatique, hépatique et osseuse en Zn chez les rats normaux et carencés, après brûlure. ....	101
Figure 29 : Evolution du rapport GSH/GSSG chez les rats normaux et carencés, après brûlure.....	101
Figure 30 : Evolution de la glycémie et de l'insulinémie après brûlure.....	122
Figure 31 : Procédure expérimentale de l'étude de tolérance à des injections IP de gluconate de zinc ...	138

Figure 32 : Effet - dose des injections en IP répétées (7 jours) de gluconate de Zn sur la concentration en cuivre du plasma, des érythrocytes, du foie et du pancréas et sur la concentration en Zn du foie et du pancréas.....	139
Figure 33 : Effet des injections de Zn sur le poids corporel.....	140
Figure 34 : Procédure expérimentale de l'étude sur les effets d'un apport en zinc après brûlure.....	150
Figure 45 : Evolution de paramètres biochimiques sanguins (ALT; AST; CK; LDH), chez les rats traités ou non par des injections de Zn, après brûlure de 20% ou 40%.....	151
Figure 36 : Evolution des concentrations plasmatiques et tissulaires, chez les rats traités ou non par des injections de Zn, après brûlure à 20% ou 40%.....	153
Figure 37 : Evolution de la concentration des groupements thiols (SH) plasmatiques, chez les rats traités ou non par des injections de Zn, après brûlure à 20% ou 40%.....	154
Figure 38 : Evolution des concentrations en SOD plasmatique et tissulaires, chez les rats traités ou non par des injections de Zn, après brûlure à 20% ou 40%. ....	155
Figure 39 : Evolution des concentrations en GPx plasmatique et tissulaires, chez les rats traités ou non par des injections de Zn, après brûlure à 20% ou 40%. ....	156
Figure 40 : Evolution de l'expression de l'ARNm de MT-IA hépatique chez les rats traités ou non par des injections de Zn, après brûlure de 20%.....	192
Figure 41 : Evolution de l'expression de l'ARNm de ZnT-1 et ZnT-4 hépatiques chez les rats traités ou non par des injections de Zn, après brûlure de 20%.....	193
Figure 42 : Evolution de l'expression de l'ARNm de Zip2 hépatique chez les rats traités ou non par des injections de Zn, après brûlure de 20%. ....	194
Figure 43 : Modèle expérimental de la brûlure chez le rat.....	238
Figure 44 : Schéma descriptif du broyage des organes en vue du dosage des enzymes anti-oxydantes, des TBARs et des protéines. ....	242
Figure 45 : Schéma descriptif du broyage des organes en vue de la PCR quantitative en temps réel.....	243
Figure 46 : Principe de la spectrométrie d'absorption atomique .....	255
Figure 47 : Schéma de la lampe à cathode creuse.....	255
Figure 48 : Schéma du nébuliseur et du brûleur.....	256
Figure 49 : Schéma du procédé d'atomisation électrothermique.....	256
Figure 50 : Appareils de spectrométrie d'absorption atomique en flamme ou électrothermique. ....	258
Figure 51: Principe d'extraction des ARNm avec le Magna Pure LC® (Roche).....	259
Figure 52 : Courbe de fusion.....	262
Figure 53 : Pic de fusion. ....	263
Figure 54 : Courbe de fluorescence en fonction du nombre de cycles d'amplification.....	264

# Liste des Tableaux

Tableau I :	Principaux risques de brûlures graves d'après la Société Française d'Etude et de Traitement des Brûlures (SFETB) .....	19
Tableau II :	Anatomie, clinique et évolution en fonction du stade de la brûlure .....	22
Tableau III :	Etudes expérimentales sur les effets d'une carence en zinc sur les paramètres du statut oxydant.....	36
Tableau IV :	Etudes expérimentales sur les effets d'un apport en zinc sur les paramètres du statut oxydant.....	41
Tableau V :	Agents inducteurs de la métallothionéine .....	78
Tableau VI :	Apports recommandés en zinc .....	82
Tableau VII :	Apports mesurés chez l'adulte en mg .....	83
Tableau VIII:	Manifestations cliniques d'une déficience en zinc .....	84
Tableau IX :	Donnés toxicologiques du zinc et de ses dérivés chez les rongeurs.....	88
Tableau X :	Prélèvements sanguins (type - quantité - post-traitement) .....	239
Tableau XI :	Prélèvements tissulaires (quantité - stockage) .....	240
Tableau XII :	Préparation du mix permettant la réalisation de la transcription inverse .....	260
Tableau XIII :	Séquences sens et anti-sens et température d'hybridation des amorces utilisées. ....	261



# **Introduction**





Les grands brûlés ayant subi des brûlures sur plus de vingt pour cent de leur surface corporelle font partie des victimes polytraumatisées, comme les patients de réanimation en état de choc ou à fort risque infectieux, nécessitant un traitement lourd. Cependant, ce sont des traumatisés d'un genre particulier : les réactions métaboliques et systémiques observées chez le patient brûlé sont comparables à celles d'autres types d'agressions, mais sont caractérisées par une ampleur et une intensité hors du commun. La destruction de la barrière cutanée, qui occasionne la perte des fonctions d'isolation, de barrière et de synthèse, est à l'origine de cette situation exceptionnelle. Toutefois, la survie de patients sévèrement brûlés n'est plus exceptionnelle car les progrès de la réanimation et de la chirurgie permettent de sauver des patients qui, il y a peu de temps encore, étaient irrémédiablement condamnés. En contre partie, la prise en charge thérapeutique de tels patients doit prendre en compte l'apparition potentielle à long terme de séquelles, délétères pour leur qualité de vie, en vue de faciliter leur réinsertion sociale. Il est donc indispensable de veiller au bon état nutritionnel de ces patients qui conditionne la qualité de leur rétablissement. Cependant, le rôle de la supplémentation nutritionnelle chez le patient brûlé reste encore trop peu exploré et un consensus dans les apports doit être trouvé pour une intervention d'urgence.

Dans un contexte combiné d'hypermétabolisme, de lésions infectieuses accrues, d'insulino-résistance et de surproduction de radicaux libres, les besoins nutritionnels sont considérables. La nutrition du brûlé fait donc partie intégrante du traitement. A côté des macronutriments qui font régulièrement l'objet de publications et dont le calcul des apports, en fonction de la brûlure, est bien déterminé, l'apport en éléments-trace n'est toujours pas uniformisé et pourrait même être parfois qualifié d'empirique. Or, les déficits de ces éléments sont à prendre en compte en raison de leur implication dans l'immunité, la réaction inflammatoire, la fonction insulinique et les défenses antioxydantes. Ces déficits seront d'autant plus importants que les déficits modérés d'apports en micronutriments, au sein de la population, sont fréquents. Ces déficits pourraient avoir des conséquences non négligeables en terme de qualité de la cicatrisation, du risque de surinfections et de temps d'hospitalisation.

Afin d'étudier avec précision les modifications de statut, les échanges tissulaires et les effets de supplémentation en éléments-trace sur un organisme brûlé, il était nécessaire, premièrement, de réaliser ces recherches sur un modèle animal et, deuxièmement, de travailler isolément sur chaque élément-trace d'intérêt. Une étude préalable a montré l'intérêt et les limites d'une supplémentation isolée rapide et massive en sélénium, il convient maintenant d'y associer d'autres éléments tels que le zinc.

Dans ce contexte, nous avons entrepris d'apporter des éléments de réponse concernant l'impact d'une carence ainsi que d'un apport thérapeutique en zinc sur le statut antioxydant, l'évolution du statut en zinc, le système glucose/insuline et l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie et le transport du Zn (ZnT, Zip, métallothionéine), grâce au modèle expérimental de rats brûlés déficients ou supplémentés en zinc, en se proposant de répondre aux questions suivantes :

- Dans les populations occidentales les apports en zinc étant souvent subdéficients, quel rôle tient le statut en zinc du patient avant la brûlure dans sa réponse à l'agression et dans l'augmentation connue du stress oxydant ?
- Un apport en zinc après la brûlure permettrait-il de restaurer le statut en zinc et d'améliorer le statut antioxydant ?
- Quelles doses de zinc serait-il possible d'administrer sans introduire de nouvelles séquelles consécutives à un surdosage ?
- Quelles sont les changements, après brûlure et après supplémentation en zinc, qui interviennent au niveau des molécules chargées de réguler l'homéostasie du zinc ?

La première partie de ce travail consiste en une étude bibliographique. Elle débute par une description synoptique des brûlures. Nous avons ensuite détaillé l'implication du zinc dans les processus permettant de lutter contre les phénomènes physiopathologiques induits par la brûlure ainsi que les conséquences physiologiques d'une subdéficience ou d'une supplémentation en zinc sur ces processus. Par la suite, nous avons décrit l'altération du statut en zinc chez les grands brûlés. Pour terminer, l'homéostasie cellulaire en zinc ainsi que l'intérêt et les limites de la correction du statut sont développés.

La deuxième partie de ce travail expérimental est consacrée au travail expérimental présenté sous forme de publications et développé en trois chapitres :

- 1 – Influence du statut en zinc dans la réponse à l'agression thermique. Etude cinétique du stress oxydant (**Publication n°1**) et de l'insulino-résistance (**Publication n°2**) induits par la brûlure.
- 2 – Intérêt de la supplémentation en zinc après agression thermique. Evaluation préalable de la toxicité d'un apport en zinc par voie intrapéritonéale (**Publication n°3**). Effet de la supplémentation sur le stress oxydant induit par la brûlure (**Publication n°4**).
- 3 – Effets du statut en zinc sur les changements induits par la brûlure au niveau moléculaire (métallothionéine et transporteurs du zinc) (**Publication n°5**).

Dans la dernière partie, afin de conclure sur le rôle du statut en zinc lors de l'agression thermique, une discussion générale synthétise l'ensemble des résultats obtenus et évoque les perspectives et les limites de notre travail.

# **Etude bibliographique**



## **Première partie : Les brûlures**



## 1. Epidémiologie

Le traitement des brûlures représente un important problème de santé publique. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les brûlures par flammes causent 322 000 décès par an et sont classées parmi les quinze causes majeures de mortalité chez les enfants et les jeunes adultes (5-29 ans) (*WHO, 2002a*). Les données concernant les brûlures par ébouillantage et électrisation n'étant pas disponibles, ce chiffre est donc largement sous-estimé. Hormis les décès, des millions d'autres personnes souffrent d'infirmités chroniques, suite à des brûlures. 95% des brûlures fatales se produisent dans les pays en voie de développement. Ainsi, l'Asie du Sud-est réunit à elle-seule la moitié des décès (11,6 décès pour 100 000 habitants). Les personnes âgées représentent un pourcentage significatif des victimes de brûlures et ont un taux de survie plus faible dû principalement à l'existence d'un terrain pathologique préexistant.

Aux Etats-Unis, chaque année, environ 700 000 brûlures requièrent une visite aux urgences. 60 000 nécessitent une hospitalisation et 4 000 patients brûlés par flammes décèdent (1,39 décès /100 000 habitants) (*WFSC, 2007*).

En France, environ 450 000 personnes sont, chaque année, victimes de brûlures. Il s'agit dans l'immense majorité des cas de lésions bénignes qui ne nécessitent que des soins locaux en ambulatoire. Le nombre d'hospitalisations pour brûlures est voisin de 10 000 par an dont 3 500 dans les 23 Centres de Traitements des Brûlés (CTB) français. La mortalité due aux brûlures est voisine de 1 000 par an (1,66 /100 000 habitants) (*Podeur, 2007; Wassermann, 2002*) dont 660 par flammes (*WFSC, 2007*).

Ce n'est qu'au niveau des CTB, et, donc, chez des patients gravement brûlés que l'on peut disposer de données épidémiologiques précises. Les enfants sont plus fréquemment touchés que les adultes. La brûlure est la deuxième cause de décès infantile après la noyade. L'enfant le plus menacé de brûlures est un garçon (61,63%) dont l'âge moyen est de 47 mois, se brûlant dans la cuisine (56,2 %) avec un liquide chaud (64,1%). La salle de bains (13,6%) est également un lieu très dangereux du fait de l'eau sanitaire (douche, bain) et de la fréquence des immersions. Les brûlures par flammes (16,95 %) provoquées par des produits volatiles sont moins fréquentes mais toujours plus graves (*Mercier, 1999*). Chez l'adulte, les accidents domestiques sont à l'origine de 70 % des cas de brûlures. Ce sont les flammes qui sont le plus souvent à l'origine des hospitalisations pour brûlures graves (50 %), suivies des explosions de gaz et des brûlures par liquide chaud.

Les progrès thérapeutiques multidisciplinaires ont permis une diminution considérable de la mortalité au cours des quarante dernières années. En 1950, un enfant brûlé sur 50% de surface corporelle décédait dans un cas sur deux (*Bull, 1954*). Au début des années 1990, cette



mortalité coïncidait avec des atteintes de 98% de la surface corporelle (*Muller, 1994*). La mortalité globale dans les CTB européens est de 4% des hospitalisés.

## 2. Etiologie

On distingue plusieurs agents responsables de brûlures causant des lésions différentes selon les conditions (*Echinard, 1993; Wassermann, 2002*):

**Les brûlures thermiques** sont les plus récurrentes (92%) :

par *contact* :

- avec un solide (braises incandescentes, fer chaud...). Elles sont limitées en superficie mais souvent profondes (selon la température de l'objet et le temps de contact).
- avec un liquide (eau bouillante, huile chaude, casserole de lait...). Elles sont généralement plus étendues et moins profondes que les précédentes. Ce sont les brûlures les plus courantes chez les enfants (60% des cas).

par *flames* :

Elles représentent plus de 70% des hospitalisations dans les CTB.

- hydrocarbures enflammés (pétrole, essence, alcool à brûler, barbecue...). Elles sont souvent étendues et profondes.
- explosions de gaz ou de vapeurs d'essence (explosion de gaz de cuisine, explosion de moteur de bateau...). Elles sont parfois en mosaïque de zones profondes et superficielles. Elles sont certes moins fréquentes mais particulièrement graves puisque, dans les CTB, leur mortalité est la plus élevée avec 26,7%.
- incendies d'appartement ou accidents de voiture. Elles sont profondes et d'autant plus graves qu'elles surviennent en milieu clos et qu'elles impliquent des lésions des voies respiratoires dues à l'inhalation de fumée.

**Les brûlures électriques** (4%) sont de deux types :

- par *arc électrique*. Elles ressemblent aux brûlures thermiques par embrasement car le courant ne traverse pas l'organisme.
- par *contact direct* avec le conducteur. Le point d'entrée du courant, généralement minuscule, cache la véritable lésion qui est souvent musculaire. Ces brûlures sont associées à des complications immédiates de type cardiaque, rénal, vasculaire et neurologique.

Les brûlures chimiques (3%) sont dues à l'action caustique d'un acide fort (acides fluorhydrique, chlorhydrique, sulfurique, ou nitrique) ou d'une base forte (soude, potasse).

Les brûlures par radiations (1%) peuvent être de trois origines différentes :

- nucléaires : par irradiation lors d'accident du travail ou de guerre,
- par rayons X : lors de traitement par radiothérapie,
- par rayonnements ultraviolets A ou B lors d'expositions au soleil.

Les accidents domestiques et de loisirs rassemblent la majorité des cas de brûlures dans la population générale, les brûlures par flammes ou eau bouillante étant de loin les plus répandues (Tableau I).

**Tableau I : Principaux risques de brûlures graves d'après la Société Française d'Etude et de Traitement des Brûlures (SFETB)**

Circonstances		
	Enfants (%)	Adultes (%)
<i>Accidents domestiques</i>	100	70
<i>Accidents du travail</i>	-	20
<i>Accidents sur la voie publique</i>	-	3-4
<i>Suicides</i>	-	6-8
Agents responsables		
<i>Flammes</i>	10-15	50
<i>Liquides chauds</i>	70	20
<i>Explosion de gaz</i>	-	10
<i>Divers (plaques électriques, vapeur, soleil, soude...)</i>	15-20	20

Quelle que soit la nature de l'agent causal, la peau, en tant que barrière protectrice de l'organisme, constitue la première cible des atteintes et son effraction aura des conséquences métaboliques.

### 3. Evaluation de l'importance des lésions

L'examen initial du brûlé est primordial pour définir les conditions de sa prise en charge thérapeutique. Elle dépendra de la gravité de ses brûlures. Cette dernière est définie par l'étendue des lésions, leur profondeur, leur localisation et l'existence d'éventuelles lésions associées.

#### 3.1. Evaluation de la surface brûlée

La surface cutanée brûlée peut être évaluée sommairement en comptant le nombre d'unités de surface brûlées, l'unité de surface retenue comme référence étant la surface de la paume de la main de la victime qui représente selon les auteurs de 0,8% à 1,25% de la surface totale du corps. Il est donc admis qu'une lésion de la surface antérieure de la main (paume + doigts) représente approximativement 1% de la surface corporelle.

D'une autre manière, le pourcentage de surface corporelle totale (SC ou *Total Body Surface Area*, TBSA) brûlée peut être calculé par "la règle des 9" de Wallace (**Figure 1**).

Pour le patient adulte, elle conduit à l'estimation de la surface cutanée brûlée en se basant sur les pourcentages suivants :

- Tête et cou : 9%
- Face antérieure du tronc : 2 x 9%
- Face postérieure du tronc : 2 x 9%
- Membres supérieurs : 2 x 9%
- Membres inférieurs : 2 x 18%
- Organes génitaux externes : 1%

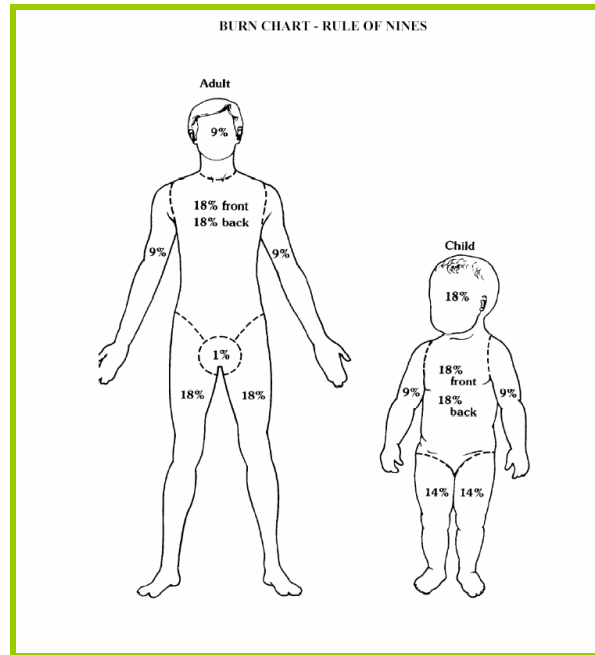
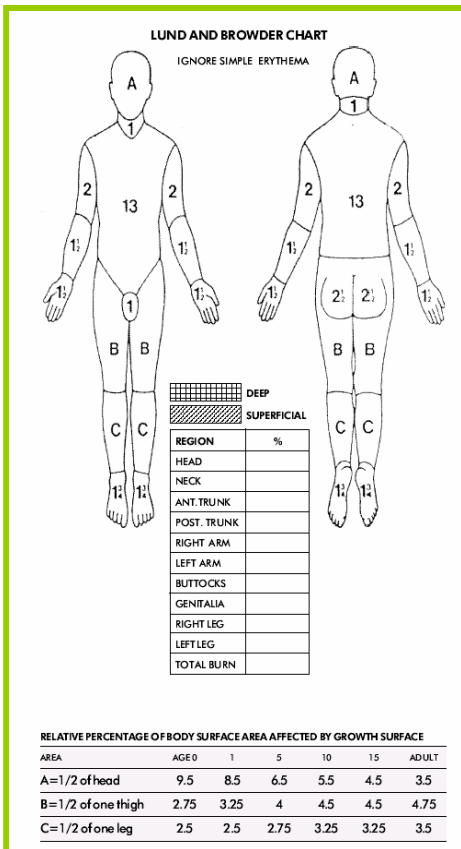


Figure 1 : Règle des « 9 » de Wallace. D'après Delaware County EMS Medical Intervention Procedures – IV. Reference Charts, 2001

La "règle des 9" de Wallace s'applique à l'adulte, le schéma proposé pour l'enfant n'étant plus accepté actuellement. D'autres méthodes apparaissent alors plus appropriées pour déterminer le pourcentage de surface brûlée, comme la table de Lund et Browder (Figure 2) (Lund, 1944).



L'évaluation de la surface brûlée est primordiale lors de l'examen initial du patient car la gravité et la survie du patient varient en fonction de l'étendue de la brûlure.

Figure 2 : Table de Lund et Browder

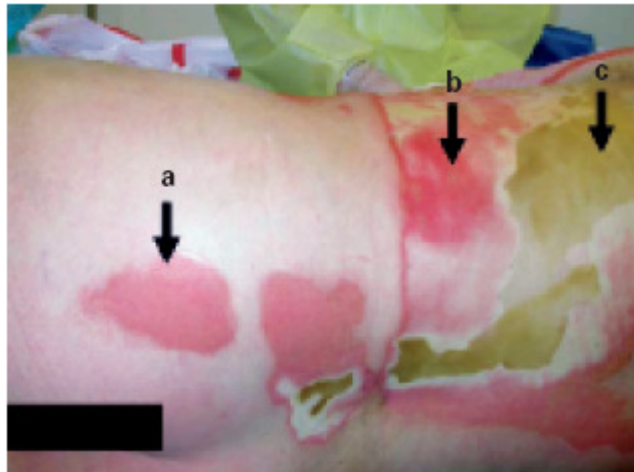
### 3.2. Profondeur de la brûlure

La profondeur d'une brûlure est évaluée à partir des critères suivants : la sensibilité, la présence de cloques ou phlyctènes (décollement des couches superficielles de l'épiderme rempli de sérosité), la coloration et la texture de la peau brûlée. L'évaluation de la profondeur est essentiellement clinique et nécessite une grande expérience professionnelle, même si le recours à des techniques non invasives telles que la thermographie infra-rouge ou le laser-doppler peut aider le praticien. On distingue trois degrés de gravité (

Tableau II et Figure 3).

**Tableau II : Anatomie, clinique et évolution en fonction du stade de la brûlure D'après Bargues et Carsin – Comprendre et évaluer les brûlures – Société Française de Médecine d'Urgence - 2003**

	Anatomie	Aspects cliniques	Cicatrisation
<b>1<sup>er</sup> degré</b>	Lésion très superficielle de la couche épithéliale	Douleur Erythème	2 à 4 jours Desquamation Pigmentation transitoire
<b>2<sup>ème</sup> degré superficiel</b>	Respecte en partie la couche basale	Phlyctènes Rouge vif Humide, suintant Douleur moyenne Saigne à la scarification	10 à 15 jours Bonne qualité
<b>2<sup>ème</sup> degré profond</b>	Respecte quelques îlots épidermiques	Blanc avec piqueté rouge Peu suintant Saigne à la scarification Blanchit à la vitropression Douleur moyenne	15 jours à 1 mois et demi Mauvaise qualité
<b>3<sup>ème</sup> degré</b>	Destruction de tous les éléments épidermiques	Pas de phlyctène Blanc, brun foncé ou rouge Insensible Réseau veineux coagulé Ne saigne pas à la scarification Ne blanchit pas à la vitropression Peau épaisse, cartonnée, indurée	Cicatrisation à partir des berges Bourgeonnement plus ou moins exubérant Nécessité de greffes cutanées



**Figure 3 : Brûlure étendue du dos à l'admission. Trois types de zones brûlées peuvent être individualisées : rouge du 2<sup>ème</sup> degré superficiel (flèche a), rose marbré et rouges du 2<sup>ème</sup> degré profond (flèche b) et brun-blanc du 3<sup>ème</sup> degré (flèche c). D'après (Raffoul, 2006).**

Selon la gravité de la brûlure l'aspect histologique diffère. La brûlure au 1<sup>er</sup> degré est caractérisée par une atteinte des couches superficielles de l'épiderme, restreinte au premier tiers du derme. La zone de nécrose (ou coagulation) est décollée de la partie viable de la plaie par un œdème (**Figure 4A**). Dans le cas d'une brûlure au 2<sup>ème</sup> degré superficiel les couches profondes de l'épiderme sont atteintes (**Figure 4B**). Lors d'une brûlure au 2<sup>ème</sup> degré profond, la jonction dermo-épidermique est atteinte (**Figure 5A**). Une brûlure au 3<sup>ème</sup> degré présente une zone de nécrose étendue sur la totalité du derme (**Figure 5B**). La vascularisation a disparu, l'innervation est détruite.

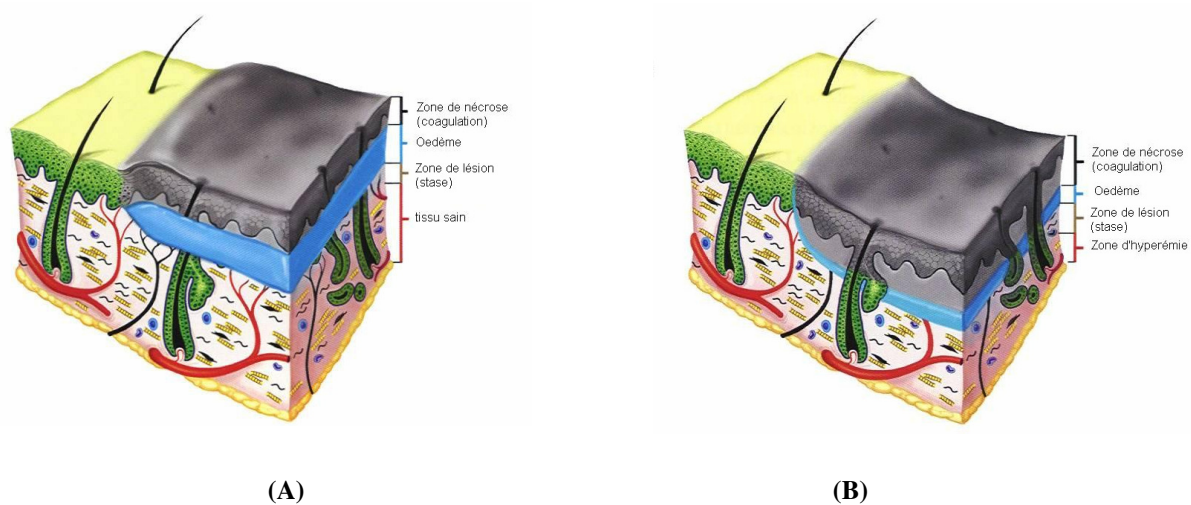


Figure 4 : Anatomie de la peau après brûlure au 1<sup>er</sup> degré (A) et au 2<sup>ème</sup> degré superficiel (B)

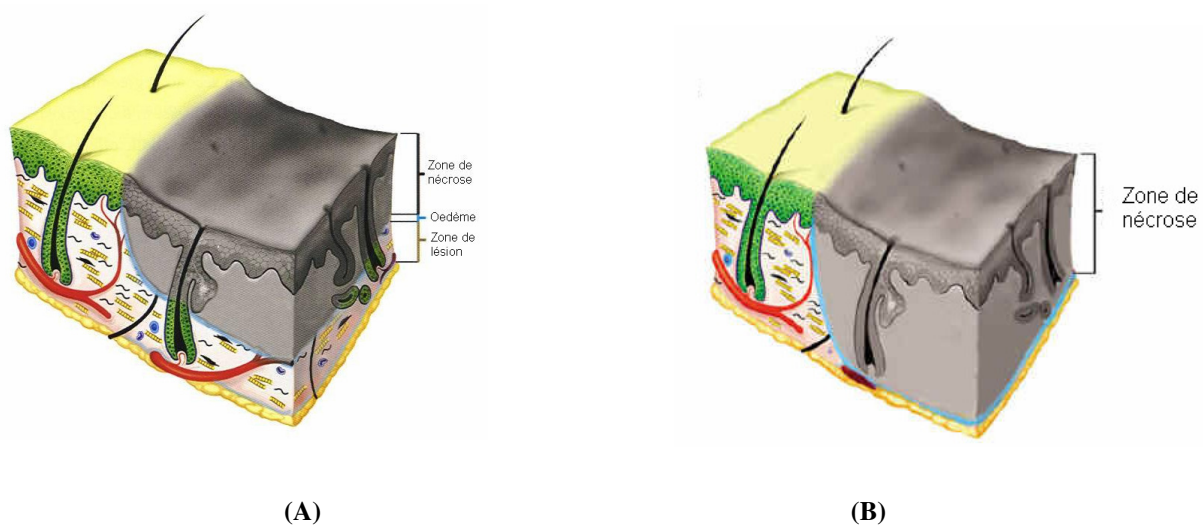


Figure 5 : Anatomie de la peau après brûlure au 2<sup>ème</sup> degré profond (A) et brûlure totale au 3<sup>ème</sup> degré (B)

### 3.3. Localisations et facteurs aggravants l'évolution clinique des brûlures

Une brûlure présente un caractère de gravité particulier en fonction de sa localisation, de l'âge de la victime ou de l'existence de lésions associées. L'ensemble de ces facteurs peut être susceptible d'engendrer un risque vital immédiat, voire un préjudice fonctionnel ou esthétique à plus long terme.

*Les brûlures de la face et du cou* s'accompagnent d'un œdème rapide qui modifie les traits du patient et le rend rapidement méconnaissable. L'œdème des paupières obstrue les yeux, mais les lésions du globe oculaire sont rares en absence de perte de connaissance. Cet œdème, surtout lorsqu'il atteint le cou et le plancher buccal, peut devenir obstructif, déterminant un risque de détresse respiratoire aiguë. A long terme, l'atteinte de la face conduit à la rétraction secondaire des paupières qui aboutit à l'exposition permanente du globe avec risque d'ulcération et d'infection ; la bouche cicatrise en microtomie.

*Les brûlures du périnée* présentent un risque d'infection qu'il faut prévenir par une antibiothérapie appropriée. Les brûlures de la verge se compliquent d'un œdème parfois obstructif. Les brûlures de la marge anale sont rares et le traitement en est difficile.

*Les brûlures des mains et des pieds* exposent à une atteinte des tendons et à l'ouverture des articulations. Leur prise en charge chirurgicale précoce permet de limiter les déformations ultérieures. De plus, elles constituent un risque d'atteinte esthétique. (figure 6)



Figure 6 : Brûlure de la main.

*Les brûlures profondes et circulaires des membres* créent un garrot. L'escarre, non élastique, ne laisse pas de place à l'expansion due à la fuite liquidienne et il en résulte une compression interne. La répercussion de ces brûlures sur la circulation artérielle et veineuse est donc à rechercher. Dans les cas les plus graves, une escarrotomie doit être envisagée rapidement.

*Les brûlures de la moitié inférieure du corps* sont souvent plus graves car elles gênent le nursing et touchent les meilleures zones de prélèvement cutané.

Après la localisation, *l'âge* de la victime est également un élément de gravité à prendre en compte : la brûlure aura un retentissement plus important aux périodes extrêmes de la vie, par exemple chez le nourrisson ou le vieillard.

L'existence d'une *défaillance d'organes* (cardiaque, respiratoire ou rénale) ou d'une *pathologie grave préexistante* vient encore aggraver le pronostic du brûlé. Il apparaît donc



primordial de rechercher des lésions associées chez les patients brûlés. Un certain nombre de règles simples peuvent aider à la recherche de ces lésions :

- un brûlé est toujours conscient. Une perte de connaissance doit faire rechercher soit un traumatisme crânien, soit une intoxication associés en fonction des circonstances de découverte de la victime ;

- un brûlé est potentiellement choqué, mais le choc de la brûlure met plusieurs minutes à s'installer, et ce choc peut être lié à une pathologie. Une hémorragie interne, en particulier intrapéritonéale, est soupçonnée devant un hématicrite normal ou bas, anormal chez un brûlé toujours hémococoncentré ;

- l'association « brûlure de la face », « notion de flammes ou de fumée » et « notion d'espaces clos » réalise la triade de Philips. Elle signe l'inhalation de fumée confirmée par un examen ORL et une bronchofibroscopie ;

- les lésions traumatiques du squelette sont difficiles à diagnostiquer dans le contexte d'une brûlure qui masque les douleurs et les déformations. Un bilan radiographique systématique doit être réalisé car la présence d'un foyer fracturaire, sous une brûlure cutanée profonde et circulaire, met en danger le membre en raison du garrot constitué par la brûlure ;

- la brûlure profonde s'accompagne d'une hémolyse qui retentit peu sur l'hématocrite, en raison de l'importance de l'hémococoncentration due à la translocation liquidienne. Cette hémolyse colore les urines en rouge, ce qui ne doit pas masquer un éventuel traumatisme rénal.

**Deuxième partie :**  
**Le zinc –**  
**Intérêt biologique chez le grand brûlé**



Parmi les éléments-trace majeurs, le zinc a un rôle clef dans la fonction immunitaire, insulinique et dans la défense antioxydante. Il est, à ce titre, très impliqué dans la réponse biologique à la brûlure. Selon la littérature, les déficits en zinc préexistant dans une grande partie de la population générale entraîneraient une vulnérabilité plus grande après brûlure et la supplémentation en zinc des grands brûlés dans les premières heures d'intervention est donc primordiale à prendre en considération.

## 1. Zinc et physiopathologie

Le Zn intervient dans l'activité de près de 300 enzymes (*Vallee, 1990*), dans l'expression de gènes, dans la stabilisation de structures nucléiques, protéiques et hormonales (*Dreosti, 2001; Yan, 2008*). Le Zn intervient ainsi dans la plupart des métabolismes. Son impact physiologique le plus important se situe dans toutes les étapes de la synthèse protéique. En effet, il active les ADN et ARN polymérase et est indispensable à la régulation des histones. Au niveau des hormones et des neurotransmetteurs, le Zn peut agir sur leur synthèse, leur sécrétion, leur activité et leur stabilité (*Colvin, 2000; Walsh, 1994*). Le Zn intervient aussi dans le métabolisme des vitamines (rétinol, vitamine B<sub>6</sub> et les folates) (*Bunk, 1989; Hong, 2000*). Les protéines « à doigt de Zn » activent l'expression de nombreux gènes et sont impliquées dans la croissance et la différenciation cellulaire (*Witkiewicz-Kucharczyk, 2006*). Le zinc agit aussi par le biais d'hormones, soit parce qu'il est un cofacteur d'enzymes de synthèse de certaines hormones (D-saturases de la synthèse des prostaglandines, 5 $\alpha$ -réductase permettant le passage testostérone-dihydrotestostérone), soit parce qu'il stabilise la structure d'hormones peptidiques leur conférant une forme active ou une plus grande stabilité (l'insuline, la thymuline, les facteurs de transcription « nerve growth factor », « epidermal growth factor », gustine), soit parce qu'il est nécessaire à l'action de récepteurs membranaires (« insulin-like growth factor 1) (*Kirchgessner, 1983*).

La liste des rôles physiologiques du zinc est encore longue (croissance, multiplication et différenciation cellulaires - reproduction et fertilité - apoptose...), mais dans le cadre de notre sujet de recherche, nous nous limiterons aux propriétés qui ont un impact au niveau du stress oxydant, de l'expression de l'insuline, de l'immunité.

## 1.1. Zinc et stress oxydant

### 1.1.1. Rappel sur le stress oxydant

La notion de stress oxydant a été évoquée en 1956 par Denham Harman lorsqu'il émit l'hypothèse que le vieillissement serait dû, en partie, à une accumulation de dommages moléculaires et cellulaires provoqués par les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Le rôle délétère de ces dernières a été, par la suite, impliqué dans de nombreuses pathologies comme l'athérosclérose (Harrison, 2003), le diabète sucré (Baynes, 1991; Laight, 1999), les maladies neurodégénératives (Jenner, 2003; Smith, 2000)... Cependant, les ERO interviennent, aussi, dans de nombreux processus physiologiques (différenciation et prolifération cellulaire, apoptose, destruction de micro-organismes et de cellules tumorales...). Elles sont produites de façon bien contrôlée, participent à l'homéostasie cellulaire et sont neutralisées par les systèmes de défense antioxydants.

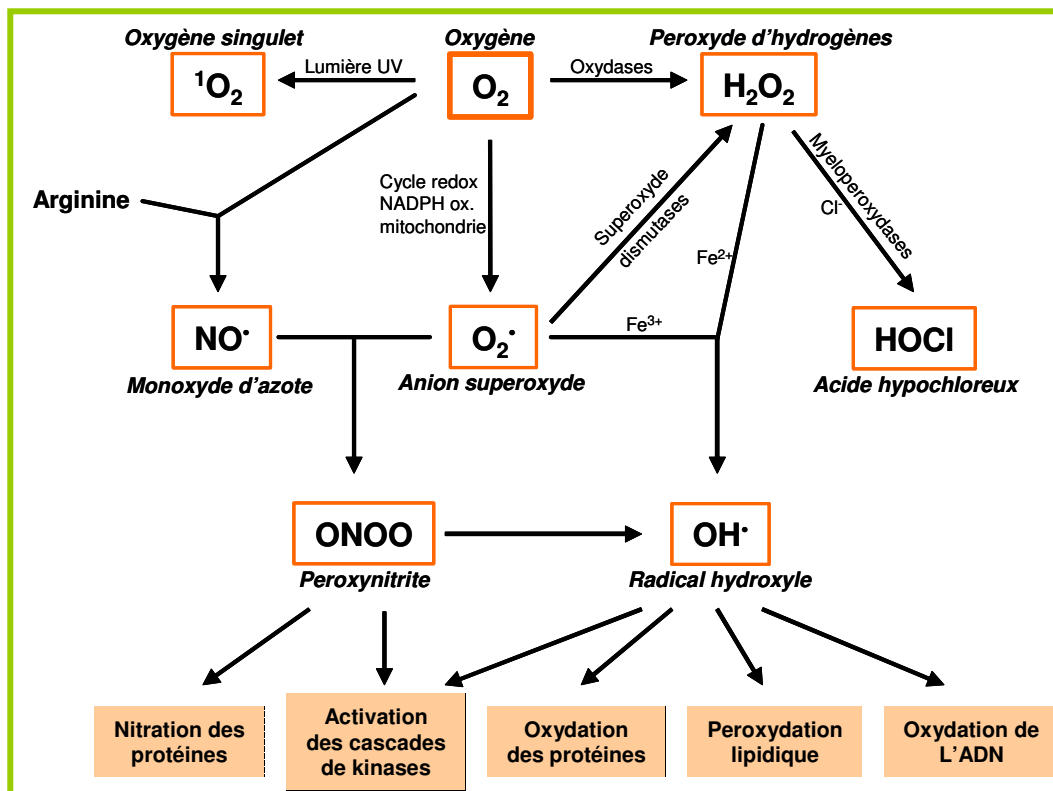


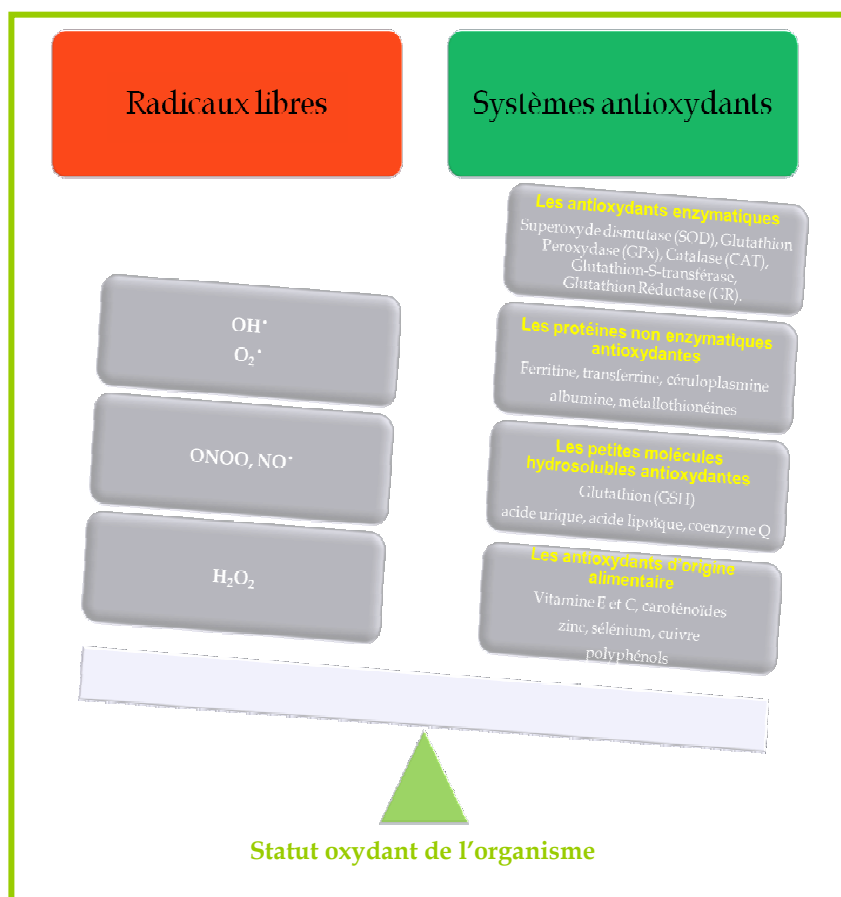
Figure 7 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie. D'après (Favier, 2003).

### 1.1.1. Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. Cette propriété rend ces composés extrêmement instables et hautement réactifs (demi-vie =  $10^{-9}$  à  $10^{-6}$ s). Dans les phénomènes de stress oxydant, les radicaux libres qui interviennent ont une propriété commune, celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène. Ceci leur confère la dénomination de radicaux libres « centrés » sur l'oxygène ou « d'espèces réactives de l'oxygène » (ERO). Les ERO peuvent avoir différentes structures (figure 7).

### 1.1.2. Les systèmes antioxydants

L'élimination des radicaux libres est assurée par des systèmes antioxydants, de nature enzymatique ou non.



Le schéma métabolique suivant (figure 8) résume la place des principaux systèmes antioxydants dans le management du stress oxydant :

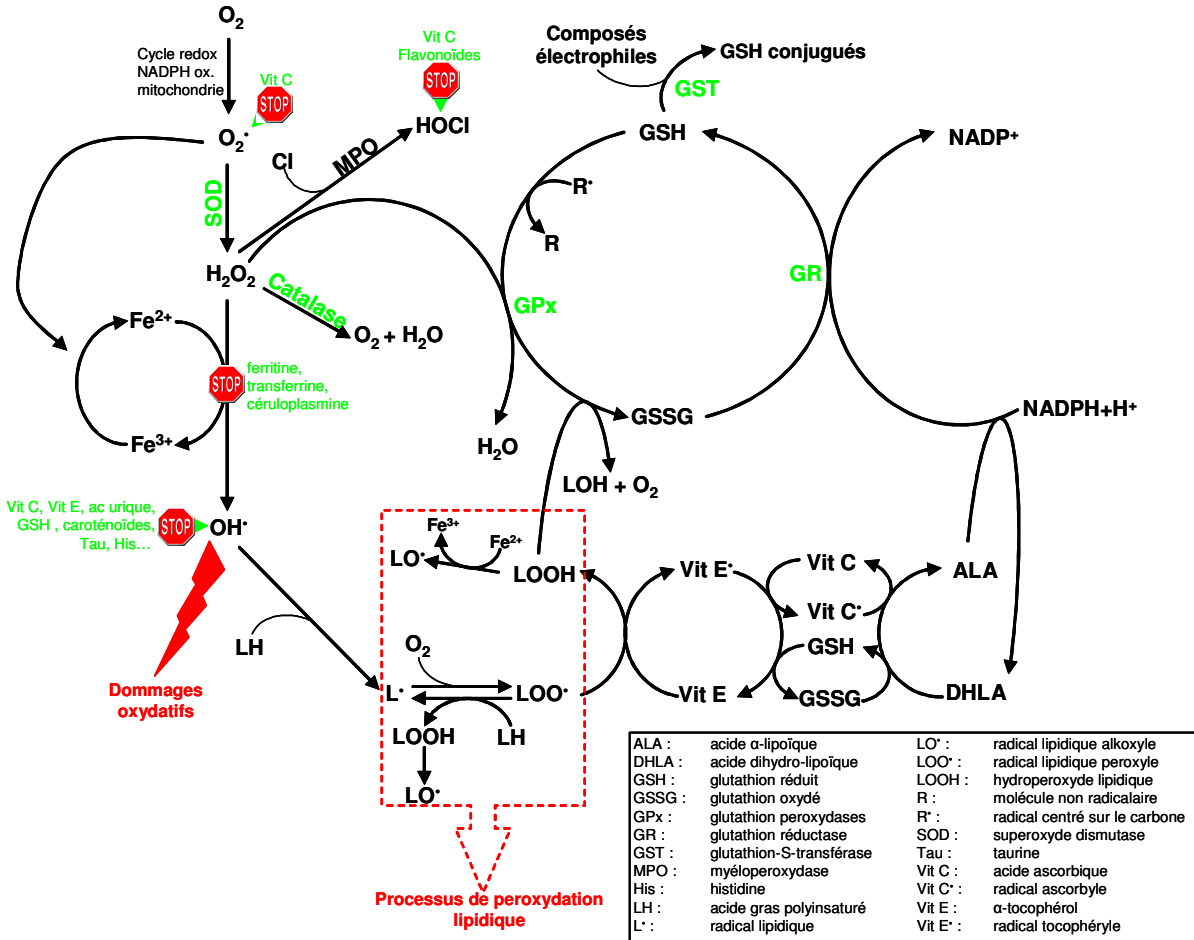


Figure 8 : Formation des espèces réactives de l'oxygène, processus de peroxydation lipidique et place des principaux antioxydants dans le management du stress oxydant. Adapté de (Fang, 2002; Valko, 2007).

### 1.1.13. Stress oxydant et brûlure

Après une brûlure grave, une réaction inflammatoire généralisée est mise en évidence dans les tissus lésés et périphériques (Mayers, 1998; Sayeed, 1998). Cette réaction crée les conditions d'un « burst » oxydatif sous forme d'une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les cellules inflammatoires activent le système NADPH-oxydase, associé à leur membrane, générant la production d'anions superoxyde, nécessaire pour protéger l'organisme contre l'invasion bactérienne, mais délétère en excès (Sabeh, 1998). En parallèle, des médiateurs sont produits de façon exagérée : histamine, cytokines pro-inflammatoires, libération de NO par les macrophages activés, production de radicaux libres, activation du complément par les radicaux hydroxyles... L'histamine, sécrétée par les mastocytes, augmente l'activité de la xanthine oxydase productrice d'anions superoxydes qui, à leur tour, stimulent la dégranulation des mastocytes (Santos, 2000). Les radicaux libres

sont en partie responsables de l'œdème observé localement et des dommages causés à distance (*Demling, 1990b*). Les acides polyinsaturés des membranes cellulaires sont des cibles sensibles à l'oxydation perpétuant la production de radicaux libres par des réactions en chaîne. Le stress oxydant est donc impliqué à la fois dans la réponse locale et dans les mécanismes de propagation des lésions aux différents organes (*Latha, 2001*).

- ***Oxydation des lipides***

Les ERO déclenchent une altération des cellules due à l'attaque des acides gras polyinsaturés membranaires par les espèces radicalaires. Ce phénomène de peroxydation lipidique provoque, entre autre, une altération de la fluidité et une perturbation des processus de transferts d'ions aboutissant à la lyse cellulaire. Dans de nombreux tissus (peau, plasma, foie et poumons), la présence d'un taux très élevé de produits de peroxydation lipidique comme le dialdéhyde malonique (MDA) est le signe d'une altération importante du métabolisme des lipides et conduit à penser que les mécanismes physiologiques de protection contre les effets délétères des radicaux libres sont largement dépassés. Les peroxydes lipidiques font partie des substances les plus nocives produites après brûlure (*Hosnuter, 2004*).

L'augmentation des produits de la peroxydation lipidique a été mise en évidence après l'agression thermique chez les patients (*Bertin-Maghit, 2000; Hiramatsu, 1984; Huo, 1993; Kumar, 1995*) ou dans des modèles animaux (*Daryani, 1990; Demling & Lalonde, 1990b; Ding, 2002; Hosnuter, 2004; Naziroglu, 2003*). La peroxydation lipidique est plus élevée chez les patients développant un syndrome d'insuffisance polyviscérale (*Yang, 1997*). Il existe une relation étroite entre l'intensité de la peroxydation lipidique et les complications après l'agression thermique (*Ritter, 2003*). Les radicaux libres et les prostanoides synthétisés, suite à la brûlure, perturbent le fonctionnement des poumons (*Jin, 1986*). La peroxydation lipidique liée à l'inflammation des poumons est corrélée aux lésions tissulaires, aux difficultés respiratoires, et à la mortalité (*Demling, 1995*). La peroxydation induite par la brûlure au niveau de la peau et des poumons peut être atténuée par l'excision de la cicatrice (*Demling, 1990a*). La production de MDA, produit final de la peroxydation lipidique, suivie chez des patients brûlés au niveau urinaire par HPLC, montre un maximum le troisième jour après la brûlure et reste en moyenne supérieure à la normale même après vingt jours (*Guichardan, 1994*). De la même façon, Kang *et al.* observe, chez des patients brûlés, une augmentation progressive du MDA urinaire pendant trois semaines, soulignant, ainsi, les dommages au niveau rénal (*Kang, 2001*).



- ***Oxydation des protéines***

Les cibles cellulaires du stress oxydant concernent également les protéines dont l'oxydation est augmentée chez le grand brûlé (*Haycock, 1997*). Les dommages aux protéines incluent l'oxydation des groupes sulfhydriques, la réduction des ponts disulfures, la réaction avec des aldéhydes, la liaison croisée avec d'autres protéines, la fragmentation peptidiques (*Starke-Reed, 1989*). Chez les patients brûlés, l'oxydation des protéines est soulignée par l'augmentation du taux de protéines carbonylées plasmatiques (*Ritter, 2003*) ou la diminution des groupements thiols totaux dans les érythrocytes (*Riazantseva, 2000*). Ritter observe une corrélation entre la quantité de protéines carbonylées et le taux de mortalité, à 0 et 6 heures (*Ritter, 2003*). Chez les animaux, les mêmes dosages sont effectués (*Sener, 2003; Zhang, 2004*).

- ***Autres dommages cellulaires et moléculaires***

Les ERO sont également impliqués dans les processus suivants :

- Endommagement des cellules endothéliales entraînant une augmentation de la perméabilité vasculaire et une agrégation de neutrophiles (*Fantone, 1982*).
- Inactivation d'antiprotéases telles que l' $\alpha_1$ -antitrypsine qui entraîne une destruction de composants structuraux comme l'élastine. L'inactivation serait due à une oxydation des résidus méthionine (*Gutteridge, 1981*).
- Dégradation de l'acide hyaluronique et du collagène.
- Désorganisation des membranes mitochondriales et lysosomales (*DelMaestro, 1980*).
- Interférence avec d'importants systèmes enzymatiques ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ /ATPase, glutamine synthétase) (*Weiss, 1986*).

Il est également important de souligner que les radicaux libres générés lors de la brûlure sont fortement impliqués dans les complications de cicatrisation : retard, épaissement et hypertrophie de la cicatrice (*Sabeh, 1995*).

### 1.1.2. Propriétés antioxydantes du zinc

Le rôle antioxydant du Zn, qui nous intéresse particulièrement dans notre étude, a été mis en évidence dans de nombreux modèles cellulaires ou animaux, protégeant, par exemple, les rats de la toxicité du tétrachlorure de carbone, de la galactosamine ou du fer (*Chvapil, 1973; Favier, 1995*). Cependant, ce n'est que depuis quelques années que son importance dans la prévention des effets toxiques dus aux radicaux libres, notamment chez les grands brûlés, a été prise en considération (*Berger, 1994; Wilson, 1988*).

Le rôle antioxydant du Zn s'exerce indirectement en assurant la stabilisation de la Cu-Zn SOD (*Forman, 1973*). Le rôle du zinc semble toutefois bien moins important que celui de l'autre cofacteur, le cuivre. Au-delà de cette fonction, le zinc possède d'autres propriétés antioxydantes pour lesquelles le mécanisme précis reste encore incomplètement connu (*Powell, 2000; Prasad, 2004*):

Le zinc inhibe la production des espèces radicalaires de l'oxygène (ERO) par les métaux de transition, en entrant en compétition avec eux dans la réaction de Fenton. Il entrerait en compétition avec le fer et le cuivre, en diminuant, d'une part, leur absorption intestinale et, d'autre part, la chélation de ces derniers par la cystéine. Or, le fer lié à celle-ci peut transférer des électrons à l'oxygène, et permettre la production d'anion superoxyde.

Le zinc protège les groupements thiols (SH) des protéines contre l'oxydation induite par le fer ou par les ERO, en empêchant la formation de ponts disulfures intramoléculaires (*Koukay, 1987*).

Le zinc inhibe la peroxydation lipidique provoquée par un mélange FeSO<sub>4</sub>/acide ascorbique, au niveau de liposomes et de micelles lipidiques.

Le zinc joue un rôle important au niveau membranaire en ayant un effet stabilisateur.

Le zinc est un inhibiteur de l'enzyme NADPH oxydase qui catalyse la production d'O<sub>2</sub><sup>•</sup> à partir d'O<sub>2</sub> (*Chvapil, 1977*).

Le zinc induit la production de métallothionéines, riches en cystéine, qui peuvent piéger les radicaux hydroxyles. Ceci entraîne la formation de ponts disulfures et, ainsi, le relargage de zinc qui pourrait alors être capté par les membranes (*Maret, 1995*).

Le zinc permet d'inhiber le facteur de transcription NFκB activé par des stimuli tels que les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF-α), les radiations, le stress oxydant.

### 1.1.3. Carence en zinc et stress oxydant

Bien que le mécanisme, par lequel le Zn agit comme un antioxydant, reste imprécis, un statut altéré en cet élément-trace a clairement un impact sur les capacités antioxydantes de la cellule et, par conséquent, de l'organisme tout entier. De nombreuses équipes ont montré une

augmentation de stress oxydant lors d'une concentration en zinc abaissée (Erreur ! Source du renvoi introuvable.). La culture de cellules, en présence d'un milieu appauvri en Zn, entraîne **une production accrue de molécules oxydantes** (Ho, 2002). **In vivo, l'augmentation des protéines oxydées et des dommages causés à l'ADN** a été démontré chez des rats carencés en Zn (Oteiza, 1995; Oteiza, 1996; Taylor, 1988). De plus, les animaux carencés en Zn sont plus **sensibles à un accroissement de la production de radicaux libres** et à une aggravation de leurs lésions que les animaux normo-nutris (Bray, 1986; DiSilvestro, 1994). DiSilvestro et al. se demande si une carence modérée en Zn peut également dérégler le statut antioxydant. Quatre observations montrent que la réponse est « oui » : premièrement, une carence modérée produit une importante élévation de la céruloplasmine, une protéine de la phase aiguë. Une élévation de cette protéine est le signe d'une inflammation et est associée à une production de radicaux libres par les phagocytes ; deuxièmement, des rats modérément carencés en Zn, sont hautement vulnérables à une hépatite induite par des substances chimiques (galactosamine ou tetrachlorure de carbone) ; troisièmement, on assiste à une absence partielle de la réponse de phase aiguë, chez ces rats carencés. Celle-ci serait médiée par une élévation limitée de la métallothionéine hépatique ; quatrièmement, les lipoprotéines plasmatiques LDL (Low Density Lipoproteins) et VLDL (Very Low Density Lipoproteins) font preuve d'une faible résistance à l'oxydation (DiSilvestro, 2000).

Le tableau suivant est une liste non exhaustive des études réalisées sur les nombreux effets d'une carence en Zn sur le statut oxydant :

**Tableau III : Etudes expérimentales sur les effets d'une carence en zinc sur les paramètres du statut oxydant.**

Support	Résultats	Références
Erythrocytes de rats carencés	Diminution de CAT, GPx, GRase, GST, SOD, potentiel antioxydant et de la concentration sérique en Zn. Augmentation de NO et du MDA.	(Taysi, 2008)
Foie de rats carencés (3,3 mg/kg)	Fe, Cu, GPx et GSH hépatique non affectés. SOD Cu/Zn, CAT diminués. MDA augmenté. Expression abaissée de l'ARNm de CAT.	(Jing, 2007)
Foie et plasma de rats carencés (< 0,05 mg/kg)	Foie : Diminution de la concentration en Zn et de $\alpha$ et $\gamma$ -tocophérol (respectivement 19, 38 et 27%). Taux du cytochrome P450 élevé. Plasma : Augmentation de F2-isoprostanes. Diminution de l'acide urique (50%). Pas de changement de vit C et de $\alpha$ et $\gamma$ -tocophérol.	(Bruno, 2007)
Muscle de rats carencés (5 mg/kg)	Expression abaissée de 4 protéines (S-glutathiolated carbonic anhydrase, myosin light polypeptide 3, heat shock protein 20, fatty acid binding protein).	(Grider, 2007)

Plasma et Foie de rats carencés (3,15 mg/kg)	Diminution de la phosphatase alcaline (40%) et de la SOD Cu/Zn hépatique (29%) Augmentation de la MT hépatique (12%)	(Sun, 2005)
Erythrocytes, plasma et tissu osseux de rates ovariectomisées (0,65 mg/kg)	La carence en Zn augmente la production d'ERO due à l'ovariectomie. Elévation du taux plasmatique de MDA. GSH osseux et érythrocytaire bas.	(Baltaci, 2004)
Foie de rats carencés (2 mg/kg)	Inhibition importante de l'expression des gènes de MT-I et II	(Pfaffl, 2003)
Foie de rats carencés (1,3 mg/kg)	L'expression de l'ARNm de 66 gènes est modifiée par la carence. Augmentation de l'expression de GPx1, GST et de la céruloplasmine. Diminution de l'expression de MT, P450, IL2	(tom Dieck, 2003)
Fibroblastes de poumons humains carencés en Zn	Accroissement de l'expression de gènes impliqués dans le stress oxydatif (GPX, SOD). Diminution de l'expression de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN. Augmentation de la production d'ERO, de dommages à l'ADN et de p53.	(Ho, 2003)
Foie de rats carencés en Zn (< 1,5 mg/kg) durant endotoxémie	Augmentation de la peroxydation lipidique. Absence d'augmentation de MT	(Sakaguchi, 2002)
Plasma, foie, cerveau et testicules de rats carencés (19 mg/kg et 3,8 mg/kg)	Augmentation de la GST dans le plasma, le foie, le cerveau et les testicules. Augmentation de la peroxydation lipidique dans le foie, le cerveau et les testicules. Augmentation de la lactate déshydrogénase dans les organes, mais diminution dans le plasma. Augmentation de l'alanine aminotransférase et de l'aspartate aminotransférase hépatiques. Augmentation des concentrations hépatiques en lipides, cholestérol, LDL et diminution en HDL.	(Yousef, 2002)
Lignée cellulaire sur milieu faiblement concentré en Zn	Inhibition de la croissance des cellules. Augmentation de la production d'ERO et des dommages oxydatifs de l'ADN. La liaison des facteurs de transcription NFκB, AP1 et p53 à leurs séquences consensus sur l'ADN est perturbée	(Ho & Ames, 2002)
Truites carencées (2 mg/kg)	Inactivation des isoenzymes SOD à Cu/Zn de type II et III	(Hidalgo, 2002)
Foie et intestin de rats carencés (<1 mg/kg)	Diminution des concentrations hépatiques (61%) et intestinale (57%) de MT.	(Szczurek, 2001)
Cerveau de rats carencés	La carence en Zn potentialise la baisse de la SOD Cu/Zn et inhibe l'expression de MT I et II.	(Penkowa, 2001)

Foie et rétine de rats carencés (5 mg/kg)	Diminution de MT hépatique, rétinienne, choroïdienne Augmentation des TBARs rétiniens.	(Miceli, 1999)
Testicules de rats carencés (0,5 mg/kg)	Baisse d'activité de SOD et GRase. GPx et $\alpha$ -tocophérol non modifiés.	(Oteiza, 1996)
Sang, foie et pancréas de rats carencés (0,5 mg/kg)	Augmentation du MDA plasmatique, hépatique et pancréatique. Diminution de GSH, SOD et thiols dans le plasma et le foie.	(Shaheen, 1995)
Testicules de rats carencés (0,5 mg/kg)	Augmentation de la production de TBARS, de la concentration des protéines carbonylées et du taux de 8-oxo-2'-deoxyguanosine.	(Oteiza, 1995)
Foie de rats carencés (4 mg/kg)	MT n'est pas impliqué lors d'une hépatotoxicité induite par CCl <sub>4</sub> . La céruloplasmine n'est pas modifié. La carence entraîne une plus faible résistance aux lésions membranaires induites par CCl <sub>4</sub> .	(DiSilvestro & Carlson, 1994)
Souris entraînées carencées (1,6 mg/kg)	Augmentation de la génération d'ERO et de la peroxydation lipidique. Inhibition de l'augmentation de SOD trouvée chez les souris entraînées ayant un statut adéquat en Zn.	(Cao, 1991b)
Poumons et foie de rats carencés (<1,1 mg/kg)	Augmentation de la SOD pulmonaire. Diminution de GSH pulmonaire et hépatique et de MT hépatique.	(Taylor, 1988)
Poumons et foie de rats carencés (<1,1 mg/kg)	Stimulation de la production d'ERO par le système NADPH et cytochrome P450.	(Bray, 1986)
Rats carencés (<1 mg/kg)	Diminution plasmatique du GSH total	(Fernandez, 1983)

#### 1.1.4. Apports nutritionnels et stress oxydant

Un apport en Zn à des organismes non seulement carencés, mais également normonutris améliore les paramètres du statut oxydant et renforce les défenses antioxydantes (Erreur ! Source du renvoi introuvable.V). Cependant, les articles les plus récents (2009) traitant ce sujet soulignent que le(s) mécanisme(s) d'action, par le(s)quel(s) la supplémentation en Zn exerce son action antioxydante, est (sont) encore mal défini(s). Le Zn n'est pas un « antioxydant direct » puisqu'il n'empêche pas les réactions radicalaires et ne possède pas de propriétés de piégeage vis-à-vis des espèces oxydantes. Il agit plutôt de manière indirecte.

Un de ces mécanismes résulte de la capacité du Zn à **remplacer les métaux de transition (Fe, Cu)** au niveau de leurs sites de liaison. De tels remplacements empêchent le cycle redox local d'intervenir. Par conséquent, la **production concomitante d'espèces radicalaires** (réaction de Fenton) est **évitée** ainsi que l'oxydation, qui en découle, des macromolécules biologiques. Zago et *al.* a mis en évidence l'effet protecteur du Zn vis-à-vis du Fe et du Cu, *in*

*vitro* (Zago, 2001). Cette étude, réalisée à l'aide de liposomes, montre que la peroxydation lipidique est plus largement évitée lorsque le Zn est en compétition avec le Fe. De plus, une concentration croissante de Zn est en corrélation inverse avec l'oxydation mesurée (TBARs) ainsi que la liaison du Fe aux liposomes. Enfin, le Zn se lie préférentiellement aux phospholipides chargés négativement et ceci sans altérer la rhéologie membranaire contrairement à d'autres métaux inertes du point de vue redox (Verstraeten, 1997).

La supplémentation en Zn agit sur **la SOD Cu/Zn** en augmentant, généralement, son activité que ce soit chez les animaux ou chez l'Homme (Amara, 2008; Andriollo-Sanchez, 2008b; Jing, 2007; Mariani, 2008). Selon Davis et al., la SOD extracellulaire pourrait même être un bon marqueur du statut en Zn (Davis, 1998a). Il remarque également une plus grande variation de cet enzyme chez l'Homme que chez le rat. Cependant, il convient de noter que certaines études mesurent, lors d'une supplémentation, une diminution de la SOD (Cao, 1991a; Yadrick, 1989) ou une absence de changement (Anderson, 2001; Roussel, 2003). De plus, une étude *in vitro*, réalisée à partir d'érythrocytes, indique que le Zn n'influence que très légèrement l'activité de la SOD (Mecocci, 2000).

Concernant **la CAT**, Mariani et al. indique qu'il n'existe pas d'étude investiguant la relation entre la supplémentation en Zn et l'activité de la CAT (Mariani, 2008). Cependant, lors des études de supplémentation en Zn, une diminution de l'activité de la CAT est généralement remarquée (Mariani, 2008; Sidhu, 2005). Ceci est vraisemblablement lié à la compétition existant entre le Fe et le Zn : une perte en Fe pourrait inhiber la genèse des enzymes ou protéines nécessitant du Fe dont fait partie la CAT. Une inhibition de la CAT diminue mais ne bloque pas les effets protecteurs du Zn dans des cellules endothéliales, indiquant que la CAT joue un rôle mineur dans la protection médiée par le Zn (Cortese, 2008).

**La GPx** ne semble pas être une enzyme réagissant à une augmentation de la concentration en Zn. Plusieurs études de supplémentation le démontrent (Jemai, 2007; Jing, 2007; Roussel, 2003). La restauration de l'activité de GPx, trouvée dans la littérature, serait plutôt la conséquence indirecte d'une protection des structures biologiques induite par l'apport en Zn vis-à-vis des dommages radicalaires. Cependant, une étude récente de supplémentation chez des porcs indique une augmentation de l'expression de l'ARNm de la GPx (Martinez-Montemayor, 2008). Une étude de Zhou et al., réalisée chez des rats ayant un dérèglement hépatique engendré par l'alcool, montre comment une supplémentation en Zn peut agir de manière indirecte (Zhou, 2005). Chez ces rats, la dégradation de l'alcool est principalement effectuée par un système enzymatique présent dans le réticulum dont le cytochrome P450 2E1 en fait partie. Les enzymes telles que l'alcool déshydrogénase (ADH) ou l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) sont moins utilisées. Hors, la voie de dégradation Cyt P450 2E1 est

une grande productrice d'espèces radicalaires. L'ADH étant une enzyme Zn-dépendant, un apport en Zn permet de restaurer son activité et de décaler la dégradation de l'alcool de la voie Cyt P4502E1 vers la voie ADH.

Le **GSH** est l'une des plus importantes molécules impliquées dans la défense antioxydante cellulaire. Or, une corrélation positive est généralement retrouvée entre la concentration en Zn et le GSH. Une supplémentation en Zn permet d'éviter la chute de GSH induite par l'alcool (Zhou, 2005). De plus l'augmentation de l'activité de la GRase indique que le Zn protège le pool de GSH, au moins partiellement, en accroissant la réduction de GSSG en GSH. Dans des cellules endothéliales, le niveau de GSH augmente grâce à l'apport de Zn. De plus, cette augmentation est principalement responsable des effets protecteurs exercés par le Zn contre la mort cellulaire induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Une inhibition spécifique de la GPx bloque totalement l'effet protecteur du Zn, prouvant que non seulement le GSH, mais aussi les enzymes « glutathion-dépendant » sont nécessaires pour médier la protection du Zn (Cortese, 2008). La régulation du GSH par le Zn passerait par une stimulation de la glutamate-cystéine ligase (enzyme nécessaire à la formation de GSH) en activant le facteur de transcription Nrf2.

Il est bien connu que le facteur de transcription **NFκB** est extrêmement sensible au stress oxydant (Bowie, 2000). L'activation de NFκB est à l'origine, au moins en partie, de processus oxydatifs délétères : déclenchement de la production de TNF-α et d'IL-1β (cytokines inflammatoires connues pour générer des ERO) (Prasad, 2004), génération de fibroses hépatiques alcooliques (Szuster-Ciesielska, 2009), mise en place de diabète de type I (Ho, 2001)... Or, dans les études précédemment citées, il a également été démontré qu'un apport en Zn permet de limiter l'activation de NFκB. Dans l'étude de Prasad et al., la supplémentation (45 mg/j) diminue la liaison de NFκB à l'ADN et réduit l'expression des gènes codant pour TNF-α et IL-1β. L'effet du Zn passerait par une activation des protéines à doigts de Zn A20 (cf. paragraphe « apports et système immunitaire »). L'étude de Szuster-Ciesielska démontre également qu'un apport en Zn à des cultures cellulaires (30 μM) inhibe l'activation de NFκB en bloquant la phosphorylation de IκB. La supplémentation en Zn permet aussi d'inhiber la voie des « Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), incluant p38 et C-Jun N-terminal kinase (JNK), qui réagit au stress oxydatif. L'étude de Ho et al. met en évidence un lien entre apport en Zn, réduction de la sévérité du diabète de type I et inhibition de NFκB. Dans cette expérience, le diabète est provoqué chimiquement par l'alloxane ou la streptozotocine qui produisent des radicaux libres et détruisent les cellules β du pancréas. Or, l'apport en Zn diminue l'activation de NFκB. Ce facteur de transcription aurait donc un rôle central dans la propagation du stress oxydatif et dans la destruction des cellules β.

Le Zn peut également exercer son activité antioxydante par l'induction des **MT**. Les MTs, petites molécules riches en cystéines, possèdent une activité antioxydante significative (Sato,



1993). Leurs rôles physiologiques endogènes sont finement associés au métabolisme du Zn (Beattie, 2000; Maret, 2003). La diminution du stress oxydant, associée à une augmentation de la synthèse de MTs, lors d'un apport en Zn est montrée (Irato, 2005; Medici, 2005). Cependant, plusieurs études montrent que l'effet protecteur du Zn pourrait être indépendant des MTs. En effet, Apostolova et al. montre qu'un traitement au Zn (1 mg/kg) protège les souris MT-KO, mais pas les souris de type sauvage (Apostolova, 1997). Ho et al. observe une diminution de la sévérité du diabète I sans induction de la MT pancréatique (Ho, 2001). Les résultats de Davis et al. vont également dans ce sens : des souris supplémentées, surexprimant le gène MT, ne montre pas plus de résistance à l'hépatotoxicité produite par CCl<sub>4</sub> que les souris « contrôle ». Les souris-KO, quant à elles, sont moins résistantes (Davis, 2001). Zhou et al. obtient le même résultat chez des souris alcoolisées (Zhou, 2005). Ces résultats ne seraient pas en faveur d'un rôle antioxydant direct des MTs car la protection devrait être dose-dépendante. Le rôle des MTs résiderait plutôt dans un maintien de concentrations tissulaires importantes en Zn et dans la régulation du trafic intracellulaire de ce métal.

Le tableau suivant est une liste non exhaustive des études réalisées sur les nombreux effets d'un apport en Zn sur le statut oxydant :

**Tableau IV : Etudes expérimentales sur les effets d'un apport en zinc sur les paramètres du statut oxydant.**

Support	Résultats	Références
Rats supplémentés en Chrome (Cr) III et Zn	La supplémentation en Zn n'a pas d'effet sur l'oxydation lipidique induite par le Cr III.	(Esen Gursel, 2009)
Cailles supplémentées (60 mg/kg pdt 30j)	Amélioration de la capacité antioxydante totale. Diminution du MDA. Diminution de la glycémie et de la protéinémie Albumine, créatinine et triglycérides inchangés	(Atakisi, 2009)
Porcelets supplémentés (3000 mg/kg)	Augmentation du ratio GSH/GSSG. Baisse de l'activité GPx et GST.	(Wang, 2009)
Adultes (55-85 ans) supplémentés (15 ou 30 mg/j pdt 6 mois)	Pas d'effet sur les marqueurs du stress oxydant et sur les défenses antioxydantes excepté une augmentation de SOD Cu/Zn.	(Andriollo-Sanchez, 2008b)
Porcs sevrés supplémentés (150, 1000, 2000 mg/kg pdt 14j)	Augmentation de l'expression hépatique de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant : Peroxiredoxine (réduction H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), glyoxalase (catalyse d'agents de glycation), GST.	(Martinez-Montemayor, 2008)



Patients atteints de drépanocytose supplémentés (75 mg/j pdt 3 mois)	Augmentation du pouvoir antioxydant. Diminution du MDA et du 8-hydroxy-2'-desoxyguanosine.	(Bao, 2008)
Personnes âgées supplémentées (10 mg/j pdt 7 sem)	Augmentation de la SOD érythrocytaire et plasmatique. Diminution de CAT et GPx.	(Mariani, 2008)
Cellules endothéliales supplémentées (100 µM)	Augmentation de la transcription de la glutamate-cystéine-ligase (GCLC) et de la concentration de GSH. Inhibition de la catalase ne bloque pas les effets de l'apport en Zn. L'expression de GCLC induite par le Zn dépend du facteur de transcription Nrf2 et non de MTF-1.	(Cortese, 2008)
Rats exposés au Cadmium supplémentés (40 mg/L pdt 30j)	Restauration de l'activité de GPx, SOD ; Diminution du MDA et de l'oxydation de l'ADN.	(Amara, 2008)
Rats exposés au Cadmium supplémentés (0,8 mg/kg, en IP, tous les 5j pdt 25 j)	Augmentation de l'activité de SOD érythrocytaire, mais pas de CAT ni de GPx. Diminution des peroxydes lipidiques.	(Jemai, 2007)
Rats supplémentés (345 mg/kg de régime pdt 6 sem)	Déclin du Cu et Fe sérique mais pas hépatique. GPx et GSH inchangés. Augmentation importante de l'expression de l'ARNm codant pour la SOD ainsi que de la SOD Cu/Zn, elle-même.	(Jing, 2007)
Lapins hyper-cholestérolémiques supplémentés (1000 mg/kg de régime pdt 8 sem)	Abaissement du cholestérol total. Diminution des produits d'oxydation du cholestérol. Diminution de F2-isoprostane plasmatique et aortique.	(Jenner, 2007)
Rats diabétiques supplémentés (150 mg/L pdt 3 mois)	Le statut oxydant des rats traités redevient comparable à celui des rats témoins pour les paramètres suivants : MDA, GPx, CAT, SOD, GSH, céruloplasmine, Zn.	(Duzguner, 2007)
Sujets humains âgés supplémentés (45 mg/j pdt 1 an)	Diminution des marqueurs du stress oxydatif (MDA, 8-hydroxydeoxyguanine). Diminution des infections et de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ).	(Prasad, 2007b)
Astrocytes en présence de concentrations croissantes de Zn	A partir de 100 µM, inactivation de la glutathion réductase. Inhibition associée à une génération accrue de ERO.	(Bishop, 2007)
Adultes (55-70 ans) supplémentés (15 ou 30 mg/j pdt 6 mois)	Pas d'effet sur l'oxydation des LDL.	(Feillet-Coudray, 2006)

Cellules de Ehrlich prélevées sur des souris pré-traitées (10 mg/kg en IP)	Les cellules de souris pré-traités résistent mieux au stress oxydatif induit par H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . L'augmentation intracellulaire de Zn et de métallothionéines serait à l'origine de la protection.	(Suntres, 2006)
Souris, ayant une défaillance hépatique alcoolique, supplémentées (75 mg/L pdt 12 sem)	Améliorations histologiques et ultrastructurales. Diminution de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALAT) et du TNF- $\alpha$ . Diminution des ERO et des produits de l'oxydation (4-hydroxynonanal, nitrotyrosine, MDA, carbonylation des protéines). Augmentation de l'activité de GPX, de GRase et de la concentration de GSH. L'inhibition par le Zn de la défaillance hépatique alcoolique est indépendante de la MT.	(Zhou, 2005)
Rats déficients en protéines supplémentés (227 mg/L pdt 8 sem)	Comparés aux rats non traités, abaissement hépatique de CAT, GPx, GST, peroxydation lipidique. Augmentation hépatique de GSH et SOD.	(Sidhu, 2005)
Rats ayant un excès de Cu supplémentés en Zn (6 g/kg de régime ou 10 mg/kg en IP)	Le Zn agit comme un antioxydant en entrant en compétition avec le Cu et en induisant la métallothionéine.	(Irato & Albergoni, 2005)
Cailles soumises à un stress thermique supplémentés (30 ou 60 mg/kg pdt 42j)	Diminution du MDA plasmatique et hépatique. Augmentation des vitamines A, C, E. Le Zn sous forme organique (picolinate) est plus efficace que sous forme minérale (sulfate).	(Sahin, 2005)
Rates ovariectomisées supplémentées (3 mg/kg en IP pdt 6 sem)	MDA plasmatique et osseux comparable aux animaux témoins. Elévation du GSH plasmatique et osseux.	(Baltaci, 2004)
Diabétiques type II supplémentés (30 mg/j pdt 6 mois)	Diminution des TBARS (15%). Corrélation négative entre TBARS et Zn plasmatique. Pas d'effet défavorable sur le statut en Cu ou le HDL.	(Roussel, 2003)
Souris MT-KO ou MT transgéniques traitées au CCl <sub>4</sub> , supplémentées (10 ou 500 mg/kg)	Hépatotoxicité induite par CCl <sub>4</sub> , détectée par les thiols, ALAT et analyses histologiques est plus importante chez les souris KO. La surexpression de MT ou la supplémentation en Zn n'apporte pas de protection supplémentaire.	(Davis, 2001)

Liposomes incubés avec des concentrations croissantes de Zn	Zn protège de l'oxydation lipidique induite par Cu et Fe mais pas de celle induite par O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> , par ONOO <sup>-</sup> , par UVC ou par des radicaux peroxydes. Zn empêche l'oxydation des membranes en occupant des sites chargés négativement ayant la capacité de se lier au Fe. L'administration combinée de Zn et d'agents antioxydants hydro- (épicatéchine) et lipophiles (Vit E) produit un effet synergique contre l'oxydation.	<i>(Zago &amp; Oteiza, 2001)</i>
Cellules endothéliales, exposées à TNF- $\alpha$ ou acide linoléique, supplémentées (10 $\mu$ M)	Diminution de la 2,7-dichlorofluorescéine, marqueur cellulaire du stress oxydatif. Expression de NF $\kappa$ B et AP-1 est atténuée. Diminution de la production de IL-6.	<i>(Hennig, 1999a)</i>
Sujets humains recevant un cocktail de vitamines et d'éléments-trace (dont Zn 20 mg/j)	Augmentation du Zn sérique 3 et 6 mois après le début des apports. La fréquence de valeurs basses (< 10,7 $\mu$ mol/L) passe de 20% à 7% après 6 mois d'étude.	<i>(Preziosi, 1998)</i>
Fibroblastes supplémentés (100 à 150 $\mu$ M)	Diminution des TBARs. Activité des enzymes antioxydantes plus basse. Augmentation de la toxicité lors d'un stress oxydant extracellulaire (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) ; Diminution lors d'un stress intracellulaire (UVA).	<i>(Richard, 1993)</i>
Souris, préalablement déficientes, supplémentées (5, 50, 500 mg/kg de régime pdt 3 sem)	Les apports 5 et 50 ppm permettent une récupération satisfaisante des paramètres testés (MDA, SOD et Zn plasmatiques et hépatiques). L'apport de 500 ppm augmente le MDA et diminue l'activité de la SOD.	<i>(Cao, 1991a)</i>
Femmes supplémentées (50 mg/j pdt 10 sem)	SOD érythrocytaire, hématoците et ferritine plus bas. Pas de changement pour la céruloplasmine et l'hémoglobine. La supplémentation perturbe le statut en Cu et Fe.	<i>(Yadrick, 1989)</i>

## 1.2. Zinc et insuline

### 1.2.1. Relations entre le zinc et l'insuline

Comme nous l'avons décrit dans la première partie, les brûlés développent un hypermétabolisme, une intolérance au glucose et une insulino-résistance. L'hyperglycémie, qui en résulte, produit des effets délétères, notamment, sur le stress oxydant, la cicatrisation et l'immunité.

Or, il existe une **relation physico-chimique entre le Zn et l'insuline**, bien connue depuis des décennies. Dans les années 30 et avant l'existence de preuves biochimiques sur la relation entre le Zn et l'insuline dans les cellules  $\beta$  du pancréas, l'ajout de Zn aux doses d'insuline commerciale permettait de prolonger l'action de l'insuline et ainsi de diminuer le nombre d'injections aux diabétiques. En 1934, Scott et *al.* découvre la nécessité du zinc pour former les cristaux d'insuline (Scott, 1934). En effet, au cours de sa maturation dans le réticulum endoplasmique rugueux, l'insuline est complexée sous forme d'hexamères avec deux atomes de Zn (figure 9). Ce complexe relativement peu soluble se cristallise dans les vésicules sécrétoires (Dunn, 2005). Des analyses en fluorescence ont permis de mettre en évidence que la concentration en Zn dans les îlots de Langerhans était en relation avec **la synthèse, le stockage et la sécrétion d'insuline** (Zalewski, 1994).

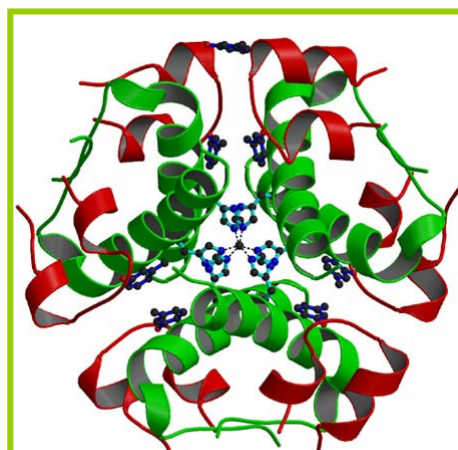


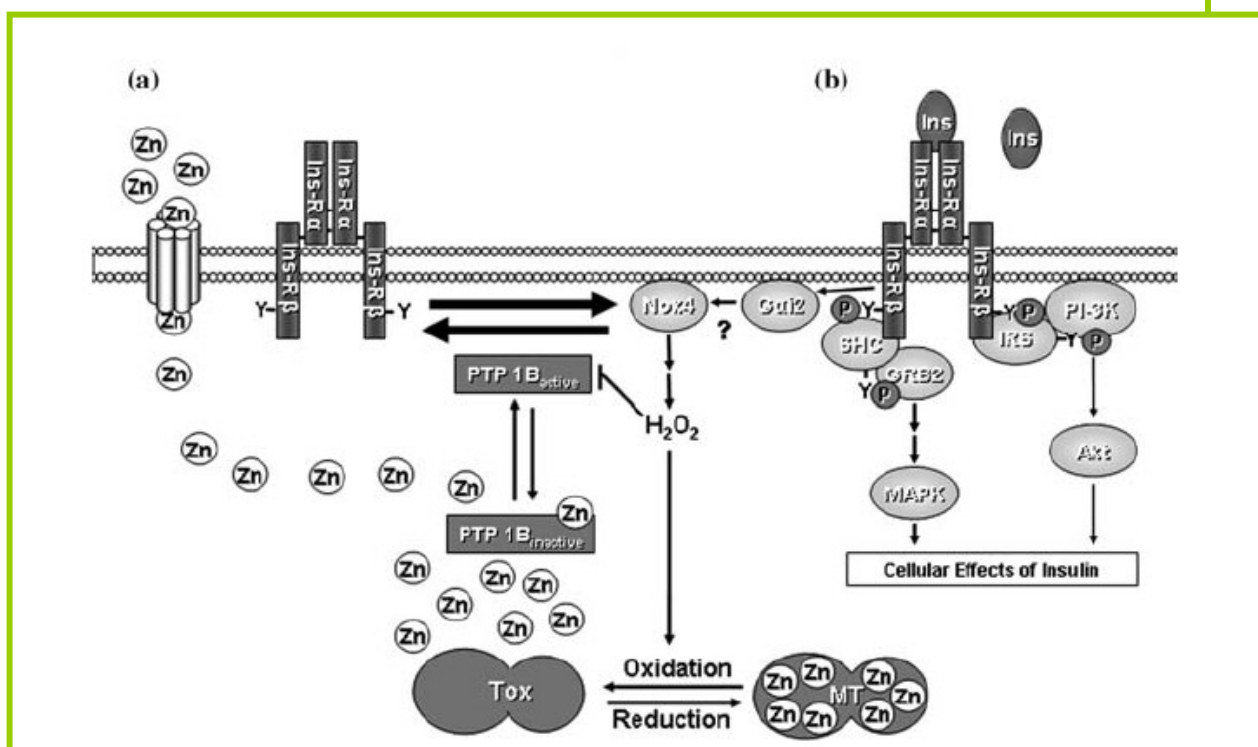
Figure 9 : Cristal d'hexamère d'insuline complexé à deux atomes de Zn.

Le Zn intervient également dans la **sécrétion d'insuline**, au niveau des îlots pancréatiques. La cascade de signalisation, induite par le glucose et permettant cette sécrétion, fait intervenir des canaux potassium ATP-dépendants (Rutter, 2004). Or, le Zn a été identifié comme étant un régulateur intra et extracellulaire de ces canaux potassiums (Prost, 2004). De plus, la liaison du Zn sur des résidus histidines des quatre sous-unités régulatrices SUR1 (« SulfonylUrea Receptor 1 ») active le canal (Bancila, 2005).

En 2004, Chimienti et *al.* découvre un nouveau gène *SLC30A8*, exclusivement exprimé dans les cellules  $\beta$  du pancréas, qui encode pour un transporteur de Zn, nommé **ZnT-8, étroitement lié au processus de stockage et de relargage de l'insuline** (Chimienti, 2004). ZnT-8 facilite l'accumulation du Zn du cytoplasme vers les vésicules intracellulaires.

D'autres transporteurs du Zn sont également présents tels que ZnT-1, 2, 5 et Zip4 (*Dufner-Beattie, 2004; Kambe, 2002; Liuzzi, 2004a*). ZnT-5 est abondant au niveau de l'appareil de Golgi et des vésicules sécrétrices, lieux d'assemblage et de stockage du complexe Zn-insuline. Seize transporteurs ZnT et Zip sont dénombrés, au total. Une telle présence de transporteurs membranaires de Zn est le corollaire d'un rôle déterminant du Zn dans le métabolisme de l'insuline.

La phosphorylation des tyrosines du récepteur à l'insuline est l'un des processus central de la transduction du signal de l'insuline. La « Protein Tyrosine Phosphatase 1B » (PTP 1B) est la phosphatase « clé » dans le mécanisme de déphosphorylation du récepteur de l'insuline (*Kenner, 1996*) et donc dans son inactivation. Or, le **Zn inhibe**, de manière réversible, l'activité enzymatique de la **PTP 1B** (*Haase, 2003*) (*figure 10*).



**Figure 10 : Effet du Zn et du couple redox sur la phosphorylation du récepteur à l'insuline.**  
 (a) Zn extracellulaire entre dans la cellule et inhibe PTP 1B. La phosphorylation de récepteur à l'insuline active des voies telles que MAP, PI-3 et Akt kinases.  
 (b) La liaison de l'insuline à son récepteur induit son autophosphorylation, l'assemblage de complexes protéiques (IRS ou SHC/GRB2) et l'activation des cascades de signalisation de l'insuline. L'insuline induit également la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, par l'intermédiaire d'une protéine-G et d'une oxydase Nox4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut oxyder la PTP 1B ou relarguer le Zn lié aux MTs. Ces deux mécanismes inactivent la PTP 1B et amplifient la cascade de signalisation. *D'après (Haase, 2005).*

La concentration du Zn intracellulaire varie et est notamment contrôlée par le système métallothionéine/thionéine. Ce système est étroitement lié aux conditions redox de la cellule. Sous conditions oxydatives, les métallothionéines relarguent le Zn qui inhibe, alors, la PTP.

En conditions réductrices, les thionéines captent ce Zn inhibiteur (Maret, 1999). Un relargage de Zn important, lors d'un stress oxydatif tel que la brûlure, entraîne une diminution du Zn cellulaire. Il s'ensuit une activation constitutive de la PTP qui inhiberait le récepteur à l'insuline et conduirait, *de facto*, à une insulino-résistance (Haase & Maret, 2005). Haase conclut que « le Zn et l'état oxydatif sont interdépendants, de telle manière qu'une déficience en Zn et un stress oxydatif sont des facteurs étiologiques potentiels du diabète » et par conséquent de l'insulino-résistance.

Enfin, le **pancréas** peut, comme tout autre organe, être la cible d'attaques radicalaires. Néanmoins, il est plus sensible à ce type d'attaques car les cellules  $\beta$  ont de plus faibles quantités d'éléments antioxydants (Lenzen, 1996). Par conséquent, **une altération du statut en Zn** aura, au vu des propriétés antioxydantes précitées de cet élément-trace, **des répercussions** sur le métabolisme de l'insuline.

### 1.2.2. Carence en zinc et insulino-résistance

En 1966, Quaterman et *al.* démontre qu'un régime induisant une carence en zinc chez le rat diminue la capacité du pancréas à sécréter de l'insuline en réponse à une charge en glucose (Quartermann, 1966). Quelques années plus tard, Boquist et *al.* met en évidence une perte de tolérance au glucose sans changement de la production en insuline chez des hamsters déficients après injection de glucose (Boquist, 1968). Cela a permis d'évoquer au moins deux conséquences d'une carence en zinc : **une inhibition de la transmission du signal post-récepteur et une diminution de la sécrétion d'insuline**. Faure et *al.* montre, en 1991, chez des rats carencés en zinc, une diminution de la sensibilité hépatique à l'insuline qui n'est pas contrebalancée par des injections croissantes d'insuline (Faure, 1991). Il conclut que la carence en zinc provoquerait une insulino-résistance induite par des modifications, soit du récepteur à l'insuline, soit des mécanismes post-récepteurs. Une carence en Zn chez des souris *db/db* (induction de diabète de type 2 et d'insulino-résistance) exacerbe l'hyperglycémie et est associée à une réduction de l'insuline circulante (Simon, 2001). Ces résultats suggèrent donc, également, qu'un apport faible en Zn aggrave le diabète par une réduction de l'assimilation du glucose par les tissus périphériques et/ou par une diminution de la disponibilité de l'insuline. Les diminutions de l'assimilation du glucose et de la disponibilité de l'insuline seraient attribuées, respectivement, à une insulino-résistance périphérique (Faure, 1992) et à un dérèglement de la sécrétion de l'insuline et /ou à une dégradation de l'insuline circulante (Huber, 1973).

La déficience en zinc est retrouvée dans les pathologies induisant une insulino-résistance telles que les brûlures (cf. [paragraphe 2](#)), le diabète (Konukoglu, 2004), les traumatismes



sévères (Berger, 2006). L'hypozincémie résulte d'une hyperzincurie, d'une absorption intestinale perturbée ou d'une perte cutanée. Chez le diabétique, une augmentation des pertes en Zn via l'urine est démontrée. Cependant, l'origine de ces pertes reste incomplètement résolue. En effet, il y a une hypozincémie et une diminution du stock de Zn tissulaire simultanées. L'hyperzincurie, ou l'effet de l'insuline et de l'hyperglycémie sur le Zn tissulaire en seraient la cause. L'hypothèse d'une déficience rénale et plus particulièrement d'un défaut de réabsorption tubulaire du zinc a été démontrée (El Yazigi, 1993). Par contre, les pertes tissulaires, cellulaires et plasmatiques ne sont pas retrouvées systématiquement (Williams, 1995). Une augmentation de l'absorption intestinale du zinc est proposée pour expliquer la compensation des pertes urinaires.

Nous avons vu précédemment que le Zn influence directement l'activité de la « Protein Tyrosin Phosphatase 1B » (PTP 1B). Une diminution de la concentration intracellulaire de cet élément-trace entraîne une activation constitutive de la PTP 1B qui maintient le récepteur à l'insuline déphosphorylé empêchant, ainsi, la cascade de signalisation intracellulaire de l'insuline (Haase & Maret, 2005). Il est donc compréhensible qu'une déficience en Zn puisse mener à une insulino-résistance. Les organismes soumis à cette insulino-résistance réagissent en augmentant la sécrétion d'insuline. Chez les brûlés et les traumatisés, nous retrouvons donc une situation semblable à celle des diabétiques, si bien que Holm parle du « diabetes of injury » chez les brûlés (Holm, 2004)! Puisque l'insuline quitte la cellule liée à du Zn, l'accroissement de la sécrétion d'insuline cause la déplétion cellulaire en Zn. En effet, la cellule peut synthétiser plus d'insuline, mais, pas de Zn. De plus, le Zn co-sécrété est vraisemblablement excrété plutôt que recapturé dans le pool cellulaire. Les cellules  $\beta$  sont donc dans l'incapacité de sécréter une quantité d'insuline suffisante pour une glycémie donnée. De plus, ces cellules deviennent plus vulnérables à tous types de dommages. Ceci est en accord avec le tableau clinique dans lequel, après une hyperglycémie prolongée et l'incapacité des cellules  $\beta$  de synthétiser suffisamment d'insuline, une perte des îlots cellulaires pancréatiques est observée. Ces deux perturbations (**activation constitutive de la PTP 1B et incapacité de synthétiser de l'insuline**) permettent un processus par lequel la déficience en Zn affecte la progression de l'insulino-résistance.

### 1.2.3. L'insulino-résistance : Une hypothèse de développement de stress oxydant.

L'insulino-résistance est une cause majeure de stress oxydant. Or dans la réponse à l'agression thermique, se développe une insulino-résistance (*Carter, 1998*).

La réponse à une brûlure grave se fait en trois phases : phase aiguë, phase hypermétabolique et phase de récupération (*Cynober, 2005*). La phase aiguë est caractérisée par une réponse inflammatoire généralisée dont l'élément clé est l'augmentation de la fuite liquidienne intravasculaire et la constitution d'un troisième espace qui peut doubler le volume du compartiment interstitiel. La phase d'hypermétabolisme s'installe ensuite et dure jusqu'à la couverture complète des blessures. L'augmentation des dépenses énergétiques est liée aux importantes déperditions caloriques dues à l'évaporation à travers des téguments qui ne remplissent plus leur rôle de « barrière » ainsi qu'aux altérations métaboliques conduisant à un état hypercatabolique (*Demling, 2000*). Ces altérations comportent une hypersécrétion des hormones cataboliques (cortisol, glucagon, catécholamines) et des cytokines proinflammatoires, une diminution des hormones anaboliques (hormone de croissance et testostérone), ainsi qu'un développement d'une intolérance au glucose (*Gore, 2002*) et d'une insulino-résistance (*Gore, 2001*) qui conduisent à une hyperglycémie. L'insulino-résistance est causée par l'inhibition de la formation d'insuline et la diminution de sa liaison à ses récepteurs conduisant à la diminution de sensibilité tissulaire à l'insuline (*Carter, 1998*). Le mécanisme moléculaire de l'insulino-résistance passerait par une altération de la transduction du signal à partir du récepteur (*Ikezu, 1997; Zhang, 2002*).

L'hyperglycémie, ainsi générée, génère des complications qui entraînent une rupture de la balance oxydants/antioxydants. Trois hypothèses sont maintenant avancées pour expliquer comment l'hyperglycémie mène à ce dérèglement :

#### 1.2.3.1. Augmentation de la voie des polyols

Les deux voies métaboliques du glucose en conditions normoglycémiques, la glycolyse et la voie des pentoses-phosphates, fonctionnent moins bien lorsque la concentration en glucose est augmentée. En effet, l'hexokinase, qui permet la phosphorylation du glucose puis son utilisation par ces deux voies métaboliques, est saturée à de fortes concentrations en glucose (*Gonzalez, 1984*). L'accumulation de glucose dans les tissus active la voie des polyols qui fait intervenir deux enzymes : l'aldose réductase et la sorbitol deshydrogénase. Ces enzymes transforment le glucose en sorbitol puis en fructose en utilisant comme cofacteur le



nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH, H<sup>+</sup>) et le nicotinamide adénine dinucléotide oxydé (NAD<sup>+</sup>) (figure 11).

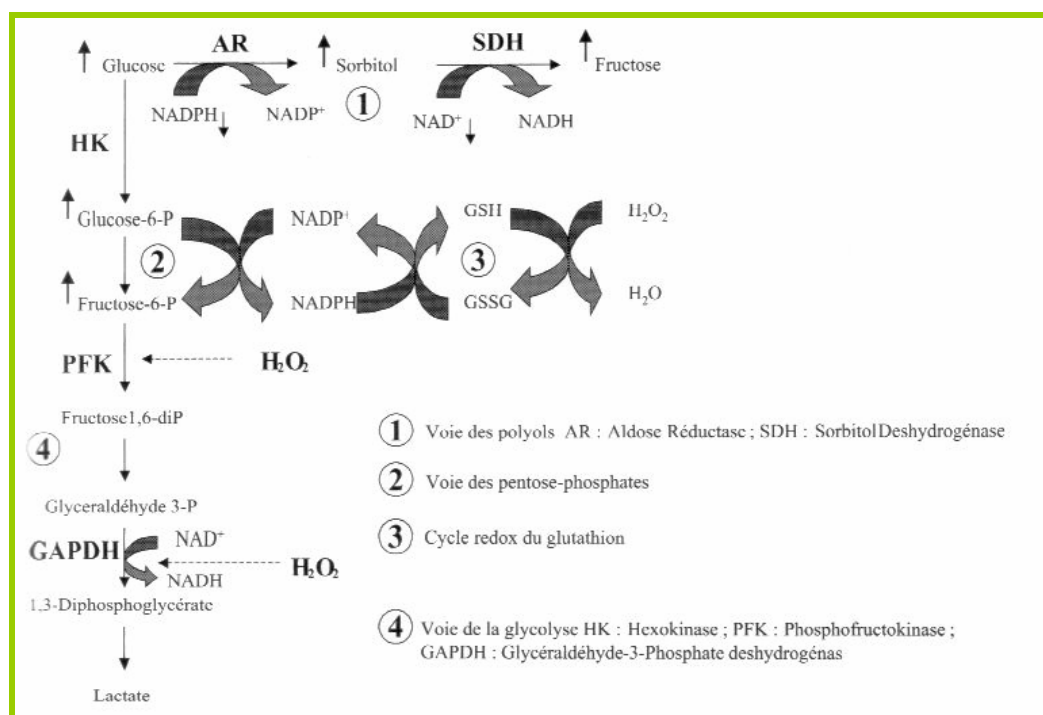


Figure 11 : Voie des polyols et autres voies métaboliques induites par l'hyperglycémie. D'après (Faure, 2005).

L'activation de cette voie conduit à l'accumulation de sorbitol et de fructose et diminue les rapports NADPH,H<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup> et NAD<sup>+</sup>/NADH,H<sup>+</sup>. L'accumulation de sorbitol perturbe la synthèse de phospho-inositides et la fonctionnalité membranaire (Greene, 1996). Mais la principale conséquence de l'activation de la voie des polyols est la modification du statut redox intracellulaire résultant de la baisse des coenzymes réduits. En effet, de nombreuses enzymes antioxydantes comme la glutathion réductase utilise le NADPH,H<sup>+</sup> comme cofacteur. Or, cette enzyme permet la régénération du GSH qui est un facteur prépondérant dans la défense antioxydante de l'organisme (Bravi, 1997). L'ascorbate réductase et la NO-synthase, utilisant également le NADPH,H<sup>+</sup>, sont impliquées dans la défense contre le stress oxydant.

La voie des pentoses-phosphates qui produit le NADPH, H<sup>+</sup> et dégrade le peroxyde d'hydrogène métabolise deux fois moins de glucose dans les cellules en milieu hyperglucosé (Asahina, 1995). Ainsi, lors de l'hyperglycémie, la réduction de la voie des pentose-phosphates contribue à diminuer le taux de NADPH, H<sup>+</sup> et à accumuler H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 1.2.3.2. Glycation des protéines

Une des conséquences de l'hyperglycémie est la glycosylation non enzymatique ou glycation des protéines. La glycation des protéines résulte de la formation d'une liaison covalente entre la fonction aldéhydique du glucose et les groupements amines libres des protéines. Cette liaison, après réarrangements, donne naissance à des produits dits « d'Amadori » qui présentent la particularité de posséder un groupement cétole. Cette fonction cétole peut, en présence de métaux de transition (situés au niveau de résidus lysine et histidine), céder un électron à l'oxygène moléculaire, conduisant à la formation d'anions superoxydes  $O_2^{\cdot-}$  (Gillery, 1988). Les produits d'Amadori sont dégradés en « produits avancés de la glycation » (AGE). La formation des AGE est dépendante des ERO, et est augmentée par le MDA ou par déplétion en GSH (Jain, 1997). Ce mécanisme amplifiant l'attaque radicalaire aboutit à la formation de complexes multimoléculaires, à la modification de la conformation des protéines ou à la fragmentation des protéines en peptides (figure 12).

La glycation de l'albumine diminue sa capacité d'épuration des radicaux libres et de chélation des métaux de transition (Dobrian, 1995). La glycation des lipoprotéines augmentent leur risque de subir une attaque oxydative. Les enzymes antioxydantes telles que la Cu-Zn SOD, la catalase et la glutathion réductase font l'objet de glycations (Arai, 1987).

Enfin, la glycation des protéines pourrait intervenir dans l'expression de certaines protéines, notamment l'insuline dont le promoteur du gène est sensible à la glycation.

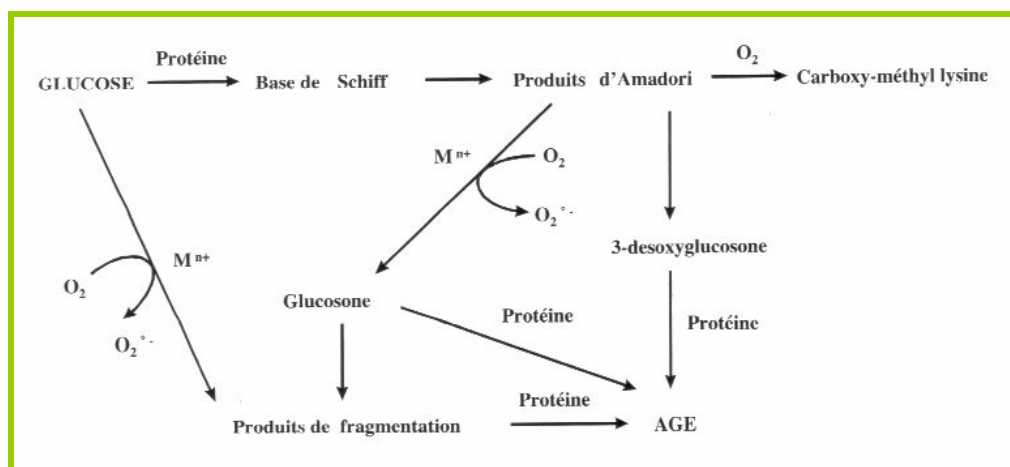


Figure 12 : Formation des produits avancés de la glycation (AGE) lors de la glycation des protéines. D'après (Faure & Bonnefont-Rousselot, 2005).

### 1.2.3.3. Production mitochondriale d'anions superoxydes

La production mitochondriale d'anions superoxydes dans les états d'hyperglycémie semble être la source principale d'ERO. Quand le gradient électrochimique de la membrane interne mitochondriale augmente, la demi-vie des systèmes générateurs d' $O_2^{\cdot-}$  augmente. Il a été

démonstré que l'hyperglycémie favorise ce gradient de protons suite à une activation des donneurs d'électrons du cycle des acides tricarboxyliques (Du, 2001; Du, 2000). En retour, ceci induit une forte production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.

#### 1.2.4. Apports nutritionnels et insulino-résistance

L'évaluation du rôle d'un apport en Zn dans l'insulino-résistance a essentiellement été réalisée sur des modèles animaux ou chez des patients diabétiques.

Un apport oral de Zn (1000 mg/kg vs 50 mg/kg de régime) permet de **retarder la survenue du diabète**, de réduire sa sévérité et d'élever la teneur plasmatique et pancréatique en Zn chez des rats Wistar BB prédisposés au diabète (Tobia, 1998). Une hypoinsulinémie peut être induite, chez le rongeur, par traitement à la streptozotocine et/ou à l'alloxane qui détruit les cellules β. Une étude sur ce modèle a permis de mettre en évidence qu'une supplémentation en Zn (mêmes doses que précédemment) diminuait l'incidence du diabète. Les effets du traitement passeraient par une inhibition de NFκB et de la « inducible Nitric Oxide Synthase » (iNOS) (Ho, 2001). Inversement, chez des souris « Non-Obese Diabetic » (NOD), un apport de Zn, dans l'eau de boisson, les protège d'un développement spontané du diabète par une activation de NFκB (Schott-Ohly, 2004). Ces études illustrent l'importance de la compréhension des mécanismes de protection du Zn dans les îlots β.

Les rongeurs *ob/ob* (déficients en leptine), *db/db* (récepteurs de la leptine déficients) ou « high-fructose » (58% du régime sous forme de fructose) permettent d'étudier, de manière spécifique, le diabète de type 2 et donc l'insulino-résistance. Un apport en Zn conséquent (1000 mg/kg de nourriture) permet, chez des souris *ob/ob*, **de diminuer l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie, d'augmenter l'insuline dans les îlots pancréatiques et d'atténuer la sécrétion anormale d'insuline d'îlots β isolés**, en réponse au glucose (Beghin-Heick, 1985). Une étude (300 mg/kg de Zn) chez des souris *db/db* obtient des résultats comparables (Simon & Taylor, 2001). Elle montre également une **restauration du statut en Zn au niveau du pancréas** ainsi qu'une diminution de la phosphorylation des tyrosines kinases induite par l'insuline. Il en est conclu qu'un apport en Zn atténue l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie en intervenant, d'une part, au niveau des cellules β et, d'autre part, au niveau de la transduction du signal du récepteur à l'insuline.

Chez des volontaires sains, un apport en Zn a permis d'améliorer l'assimilation du glucose. Cependant, l'auteur de cette étude préfère parler **d'effet insulino-mimétique du Zn** (stimulation du transport du glucose, oxydation par la voie du pentose phosphate) plutôt que d'amélioration de la sensibilité à l'insuline (Brun, 1995). Deux études conduites chez des

obèses (*Gomez-Garcia, 2006*) et chez des diabétiques de type 2 (*Beletate, 2007*) n'ont pas trouvé de bénéfice quant à l'utilisation d'un apport en Zn.

La sécrétion d'insuline semble stimuler simultanément la production de ROS (*Fridlyand, 2004*). Ainsi, une sécrétion d'insuline anormalement élevée est accompagnée d'une production accrue de ROS. Un stress oxydatif peut se développer si le système de défense antioxydante est inefficace à détoxifier la poussée de radicaux libres. Le Zn peut contribuer à protéger les tissus, par son activité antioxydante directe (*Powell, 2000*) ou via l'inhibition de facteurs de transcription sensible au statut redox et de voies apoptotiques et inflammatoires (*Ho, 2001; Ho, 2004*). Une étude de Faure et *al.* met en évidence une **amélioration de l'insulino-sensibilité**, chez des rats « high-fructose » recevant un apport de Zn combiné à de la vitamine E et du sélénium. Ceci serait induit par une protection accrue des groupements thiols et par une augmentation du niveau de GSH (*Faure, 2007*). Des lapins diabétiques voient également leurs paramètres antioxydants (GPx, SOD, CAT, GSH) s'améliorer après supplémentation en Zn (*Duzguner & Kaya, 2007*).

## 1.3. Zinc et immunité

### 1.3.1. Implications du zinc dans le système immunitaire

Le Zn joue également un rôle important sur les fonctions immunitaires (*Hirano, 2008; Walsh, 1994*). Il est vraisemblable que les réponses des cellules immunitaires soient régulées par l'homéostasie intracellulaire du Zn (*Ibs, 2003*). De nombreuses maladies chroniques (cirrhoses, insuffisance rénale, cancers, arthrite auto-immune) mènent à une déficience en Zn. Ces pathologies sont associées à une augmentation des infections. Ceci suggère, par conséquent, un rôle du Zn dans l'homéostasie des cellules immunitaires (*Fraker, 2000*).

Le Zn joue un rôle important dans la **régulation de l'activité du thymus** (*King, 2002*) et dans **l'expression des gènes des cellules T et dendritiques** (*Moore, 2001*). Le Zn régule, également, **l'activité des tyrosine phosphatases** qui influencent l'expression des cytokines (*Bao, 2003*). L'exposition de cellules dendritiques à du lipopolysaccharide (LPS), endotoxine bactérienne, entraîne une diminution intracellulaire de la concentration en Zn et déclenche leurs maturations. A l'inverse, une élévation artificielle du Zn intracellulaire supprime la capacité de la cellule dendritique à répondre au LPS. En fait, le LPS, affectant l'expression de transporteurs de Zn (surexpression des transporteurs ZnT, inhibition des transporteurs zip), conduit à une diminution intracellulaire du Zn. Ceci permet l'exocytose de marqueurs membranaires spécifiques (MHCII) qui déclenche les réponses immunologiques

(activation des cellules T CD4+) (*Kitamura, 2006*). Le **Zn est présent dans les mastocytes et permet la dégranulation et la production de cytokines** (*Kabu, 2006*).

Le TNF $\alpha$  provoque l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1, ainsi que la sécrétion d'IL8. La supplémentation du milieu en zinc provoque une diminution de l'activation de ces facteurs et de la sécrétion de l'IL8 (*Connell, 1997*). La fixation d'IL1 sur ses récepteurs entraîne dans plusieurs types cellulaires (foie, moelle osseuse, thymus) un passage accru du zinc du compartiment extracellulaire vers le cytosol. Ce mouvement est provoqué par induction très rapide des métallothionéines (*Cousins, 1988a*). Par un mécanisme identique, l'IL6 provoque une augmentation de la synthèse de métallothionéines dans l'hépatocyte, provoquant une captation accrue du zinc à partir du milieu extracellulaire (*Schroeder, 1990*).

De nombreuses molécules présentes dans les cellules immunitaires comportent des **motifs de liaison au Zn**. **Lck** est une tyrosine kinase de la famille Src qui propage le signal nécessaire à la maturation des lymphocytes T. Quatre résidus « cystéines », hautement conservés, coordonnent un site de liaison au Zn qui permet la formation d'un complexe « Lck-récepteur CD4 ou CD8 » et donc son activation (*Huse, 1998*). La protéine cytoplasmique **A20** contient sept structures à doigts de zinc (*Makarova, 2000*). Une surexpression de A20 inhibe la mort cellulaire induite par TNF $\alpha$  et l'activation de NK $\kappa$ B (*Beyaert, 2000*). **TRAF6** a trois structures à doigts de zinc et permet la transduction du signal de la superfamille des récepteurs TNF pour activer les facteurs de transcription NF $\kappa$ B et AP1. Des souris déficientes en TRAF6 montrent une inflammation au niveau de nombreux organes. **ZFAT**, une protéine nucléaire, d'au moins treize structures à doigts de zinc, est exprimée dans les cellules T CD4+, T CD8+, monocytes, cellules B CD29+, et joue un rôle crucial dans les cellules B qui sont impliquées dans le développement des maladies auto-immunes de la thyroïde (*Shirasawa, 2004*). De nombreuses autres molécules ayant des motifs de liaison au Zn sont décrites dans la littérature : la prévalence de ces motifs indique que le Zn joue un rôle critique dans le système immunitaire et représente un composant constitutif essentiel.

### 1.3.2. Carence en zinc et système immunitaire

De nombreuses études ont montré qu'une carence en zinc augmente la sensibilité de l'organisme aux agents pathogènes et affecte l'immunité spécifique et non spécifique (*Cuevas, 2005; Ripa, 1995*). Sont caractéristiques d'une déficience en zinc, une **lymphopénie, une dépression des lymphocytes T et B** dans les tissus lymphoïdes centraux et périphériques ainsi qu'une diminution de la réponse aux agents mitogènes (*Shankar, 1998*). La granulopoïèse et la myélopoïèse résisteraient mieux que la lymphopoïèse à une

carence en zinc (Fraker, 1998). La production et l'activité biologique des médiateurs solubles de l'immunité telles que **les cytokines** (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, INF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) ainsi que la fonction des cellules Th1 et Th2 **sont altérées** par une carence en zinc (Rink, 2000). Chez l'Homme, le déficit en Zn entraîne **une diminution de l'activité de la thymuline et des cellules NK, une réduction de la production d'IL-2, d'INF- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$** . Il n'affecte pas la production d'IL-4, IL-6 et IL-10. Ces résultats suggèrent que le déficit en Zn altère la réponse Th1 mais pas Th2 (Calder, 2001; Prasad, 2007a). La carence en Zn a un effet majeur sur le développement des cellules B et entraîne un déclin de ces dernières. Pfaffl et al. relève un déficit de l'expression de gènes impliqués dans la cascade de la réponse immunologique des cellules B tels que des marqueurs et récepteurs membranaires (CD19, CD22, CXCR4...) (Pfaffl, 2003).

La déficience en Zn **altère** également l'activation des facteurs de transcription **NF $\kappa$ B et AP-1** qui jouent un rôle pivot dans l'immunité acquise et innée, dans l'inflammation ainsi que dans le développement, la prolifération et la survie cellulaire (Herbein, 2006; Shen, 2008). Bien que NF $\kappa$ B soit activé par le stress oxydant, la déficience en Zn est généralement associée à une diminution de l'expression des gènes dépendants de NF $\kappa$ B. Lors d'une carence, il a été décrit une diminution de la liaison de NF $\kappa$ B à l'ADN, dans des extraits nucléaires (Ho & Ames, 2002; Oteiza, 2000). Cet effet serait dû à une altération dans la polymérisation de la tubuline, consécutive à la carence en Zn, qui empêcherait la translocation nucléaire de NF $\kappa$ B activé (Oteiza, 2000). A contrario, dans certains types cellulaires, principalement des cellules primaires, une carence en Zn entraîne une activation accrue de NF $\kappa$ B avec pour conséquence l'augmentation de la production d'IL-6 (Hennig, 1999b).

Comme pour NF $\kappa$ B, une carence en Zn résulte soit à l'activation, soit à l'inhibition de AP-1, selon le type cellulaire impliqué, le niveau d'activation cellulaire et le type de stimulus induit (Herbein, 2006). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est le principal déclencheur de l'activation de AP-1, par la voie de transduction des MAP kinases, puisque une incubation en présence de catalase prévient cette occurrence (Zago, 2005). Il convient de noter que les désordres immunologiques, obtenus lors des carences en zinc, sont pour la plupart abolis par un retour à un apport normal en zinc.

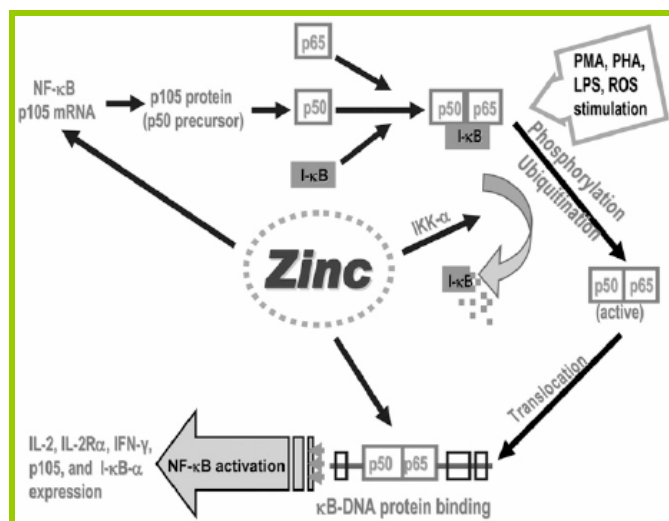
### 13.3. Apports nutritionnels et système immunitaire

De nombreuses études ont montré, chez l'Homme, les bénéfices d'une supplémentation en Zn en ce qui concerne la récurrence des infections. Des tests de supplémentation chez des enfants mal nourris, déficitaires en Zn, permettent de **réduire** de 25 à 30 % la survenue des **diarrhées** et de plus de 50% les **infections respiratoires et cutanées** (Sazawal, 1998). A été également remarquée **une croissance du thymus** (Calder, 2000). Parallèlement, l'activité

de la thymuline, une hormone spécifique du thymus nécessaire, entre autres, à la maturation des lymphocytes T et à la production d'IL-2, est corrigée par un apport en Zn, chez des hommes préalablement déficients (*Prasad, 1988*). L'administration de Zn (1 mg/kg/j pendant 30 jours) à des enfants prématurés **augmente le nombre de lymphocytes T** circulants ainsi que la prolifération lymphocytaire (*Chandra, 1991*). Chez des enfants de faible poids de naissance ayant présenté un retard de croissance gestationnelle, l'apport pendant six mois de 5 mg de Zn par jour **améliore l'immunité à médiation cellulaire** et diminue l'incidence des infections respiratoires supérieures et gastro-intestinales (*Calder & Jackson, 2000*). La dose de 1 mg/j n'a aucun effet. Un apport de Zn (75 mg), chez des patients atteints de drépanocytose, permet de réduire l'incidence des infections. Dans les cellules mononucléaires (MNCs), l'expression des ARNm de TNF $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  induite par du lipopolysaccharide ainsi que la liaison de NF $\kappa$ B à l'ADN sont également réduites. Enfin, l'apport de Zn, *ex vivo* dans les MNCs, corrige la génération d'IL-2 (*Bao, 2008*). Une étude clinique de supplémentation, réalisée chez des personnes âgées, sur une durée de douze mois, à raison de 45 mg de Zn/j, a montré des résultats similaires. Dans le groupe supplémenté, l'incidence des infections et la génération, *ex vivo*, de TNF- $\alpha$  et de IL-1 $\beta$  sont moindres ; les marqueurs du stress oxydatif sont également abaissés ; par contre, les quantités d'ARNm codant pour IL-2, dans les cellules mononucléaires, sont plus élevées (*Prasad, 2007b*). A contrario, une étude de Aydemir et *al.*, consistant en un apport de 15 mg/j de Zn chez des adultes sains, met en évidence une augmentation des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  (*Aydemir, 2006*).

**Au niveau cellulaire et moléculaire**, des études ont été menées sur le rôle du Zn dans l'activation de NF $\kappa$ B, un facteur de transcription primordial dans la régulation du système immunitaire. Le rôle du Zn diffère selon les types cellulaires. Chez l'Homme, une supplémentation en Zn inhibe l'induction de NF $\kappa$ B induit par TNF- $\alpha$ , dans les cellules mononucléaires sanguines (*Prasad, 2004*). Dans des cellules HUT-78, cellules malignes humaines de lignée lymphoblastoïde Th0 (lymphocytes T immatures), un statut optimal en Zn est indispensable pour l'activation de NF $\kappa$ B. En effet, premièrement, Zn est nécessaire à la synthèse de l'ARNm p105, un précurseur de la sous-unité p50 de NF $\kappa$ B ; deuxièmement, « Inhibitory- $\kappa$ B kinase  $\alpha$  » (IKK- $\alpha$ ), nécessaire à la phosphorylation de «  $\kappa$ B- $\alpha$  inhibitory protein » (I $\kappa$ B- $\alpha$ ), est une enzyme Zn-dépendante ; troisièmement, la liaison de NF $\kappa$ B à l'ADN nécessite du Zn (*Prasad, 2001*) (**figure 13**).



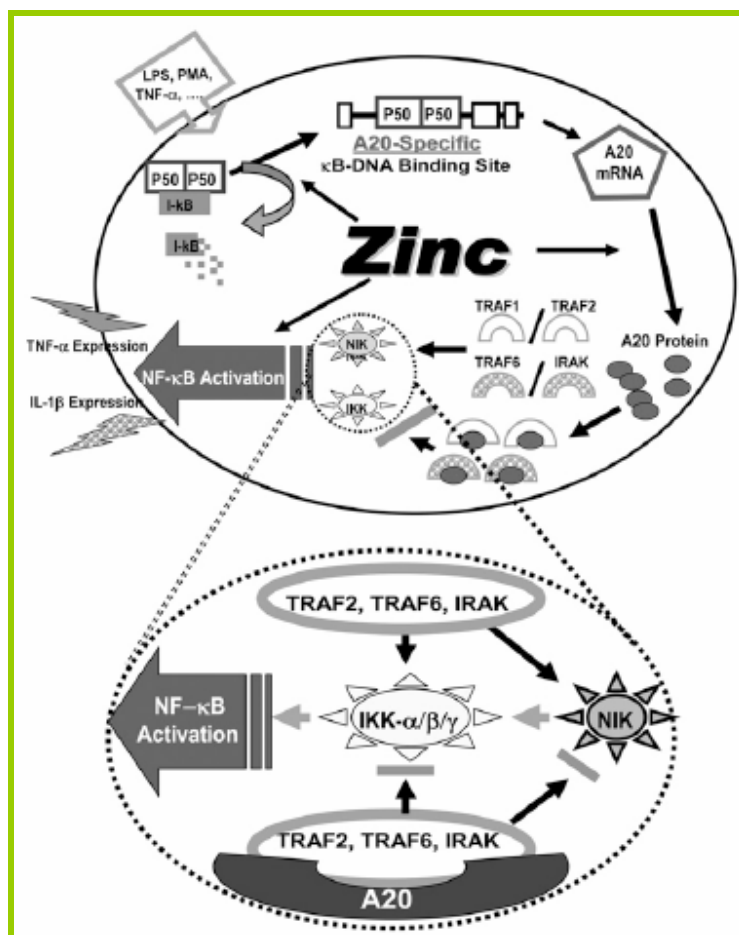


**Figure 13 : Effet du Zn sur l'activation de NFκB dans les cellules HUT-78. Zn est nécessaire à l'expression de l'ARNm p105, à la phosphorylation de IκB et à la liaison de NFκB à l'ADN. D'après (Prasad, 2007a).**

Or, dans les cellules HUT-78, l'activation de NFκB entraîne la production d'IL-2, une cytokine « clé » dans l'expansion et la maturation des thymocytes et de la population des cellules T périphériques, dans la génération des cellules T cytotoxiques et de cellules « Natural Killer » et dans le retardement de réponses de type « hypersensibilité » (Prasad, 2002).

Dans des cellules HL-60, appartenant à la lignée pro-myéloïde et pouvant se différencier en monocytes-macrophages, le Zn augmente l'expression de la protéine à doigts de Zn « A20 » qui, en inhibant IKK-α, empêche l'activation de NFκB. Or, dans HL-60, cette activation mène à une libération des cytokines pro-inflammatoires TNF-α et IL-1β (Prasad, 2008b) (figure 14).





**Figure 14 : Inhibition de NFκB par les protéines A20 induites par le Zn dans les cellules HL-60. Zn stimule la production de A20 dans ces cellules. La liaison de A20 aux molécules TRAF ou IRAK, empêche ces derniers d’activer IKK et NFκB-Inducing Kinase (NIK) entraînant une diminution de la phosphorylation de IκB, nécessaire à l’activation de NFκB. D’après (Prasad, 2007a).**

Enfin, il existe une relation étroite entre stress oxydant, système immunitaire et statut en Zn optimal. En effet, les cytokines pro-inflammatoires sont connues pour générer une production de ERO. De plus, l’augmentation de ces cytokines est généralement associée à une diminution du statut en Zn. Lors des études de supplémentation, l’abaissement des cytokines inflammatoires est souvent corrélé à la décroissance des marqueurs du stress oxydant (Prasad, 2004; Prasad, 2007b). Le facteur de transcription NFκB est activé par de nombreux stimuli tels que le stress oxydant, les cytokines, les radiations... Enfin, le Zn diminue la génération des ERO (SOD, métallothionéines et inhibition de la NADPH oxydase) et inhibe l’activation de NFκB par l’intermédiaire de A20 (figure 15).

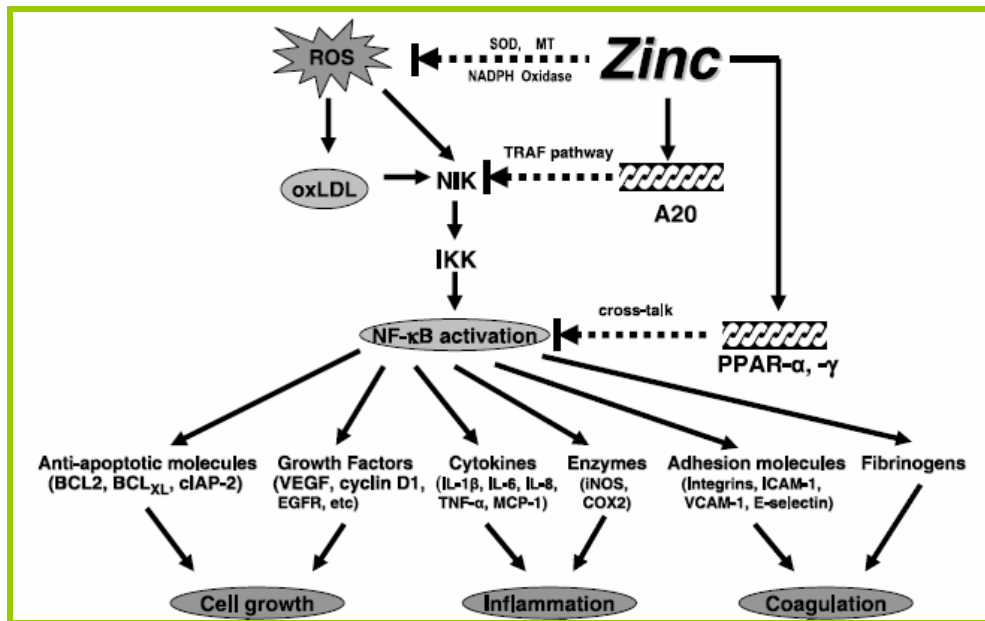


Figure 15 : Zn, un agent antioxydant et anti-inflammatoire.  
Les flèches en pointillé signifient une inhibition. *D'après (Prasad, 2008a).*

## 2. Brûlure et altération du statut en zinc

Le zinc est nécessaire au fonctionnement cutané comme en témoigne la parakératose cutanée des animaux carencés ou l'acrodermatie entéropathique. Ce rôle peut s'expliquer par un effet global sur la synthèse des protéines et plus particulièrement celle du collagène, par un antagonisme zinc-cuivre sur la réticulation du collagène par la lysyl oxydase, et enfin par un effet sur la prolifération des fibroblastes (*Fernandez-Madrid, 1976*). Le zinc jouerait aussi un rôle spécifique sur le métabolisme de la cystine : une carence en zinc provoque une excrétion urinaire accrue des sulfates et une diminution de l'incorporation de la cystine marquée dans la peau (*Hsu, 1977; McConnell, 1974*). Le traitement de l'acné par le zinc per os s'est avéré efficace dans de nombreuses études en double aveugle.

La régénération du tissu cutané est ainsi donc sensible au statut en zinc ainsi que l'ont montré les retards à la cicatrisation après incision chez les rats carencés (*Sandstead, 1970*). En utilisant du zinc radioactif, on constate qu'il s'accumule dans les zones de réparation cellulaire. Le mécanisme d'action se situe à différents niveaux : parmi les mieux étudiés, le zinc est nécessaire à la multiplication des fibroblastes, mais aussi au métabolisme du collagène sécrété par ces cellules et renouvelé par une collagénase à cofacteur zinc. Une hyperréticulation et une fibrose sont constatées dans les carences expérimentales en zinc (*Fernandez-Madrid, 1976*).

De ce fait, les altérations du statut en zinc sont importantes à prendre en considération dans le cadre du traitement des grands brûlés

### 2.1. Evolution des micronutriments chez les grands brûlés

#### 2.1.1. Déficits en micronutriments chez le grand brûlé

Les déficits en minéraux, micronutriments et microconstituants sont très élevés chez les patients brûlés comparés aux autres traumatismes. Ils restent, cependant, mal connus car peu étudiés.

La perte de la barrière cutanée distingue les patients brûlés des autres patients traumatisés. Ceci entraîne des problèmes spécifiques nécessitant un suivi particulier au sein d'unités spécialisées. La peau a une fonction de « barrière » importante (fluides, température, micro-organismes, une fonction immune et endocrine) (*Allgower, 1995*). Depuis les années 60, les déficits en micronutriments impliquant les éléments-trace (Cu, Zn, Se, Mn) et les vitamines (A, B et E) ont été largement décrits chez les patients ayant des brûlures étendues (*Boosalis,*

1988; Cunningham, 1991; Hunt, 1984; Lafargue, 1976; Larson, 1970; Selmanpakoglu, 1994; Shakespeare, 1982). Les pertes exsudatives intensives au niveau des plaies sont caractéristiques et expliquent largement les déficits en micronutriments observés (Berger, 1992b; Berger, 1997). Ceci perdure jusqu'à la cicatrisation complète. Aggravent également les pertes, les excisions chirurgicales pratiquées, les diarrhées, les drains, les fistules et les aspirations (Figure 28). Les déficits sont proportionnels à la sévérité de la brûlure et sont associés à des problèmes de cicatrisation ainsi qu'à des complications infectieuses (Berger, 2004). Les grands brûlés présentent des carences en micronutriments également en raison d'une consommation exacerbée et d'un déficit d'apports qui ne comble pas les besoins augmentés après la brûlure.

Les concentrations plasmatiques en micronutriments, à l'exception du fer (Guo, 1997), sont abaissées (voire effondrées) au-delà de ce que provoque une réponse inflammatoire, même intense. Une semaine après le traumatisme, si aucun traitement substitutif n'est mis en place, les patients ont des déficits aigus importants en micronutriments, ce qui traduit un dysmétabolisme pour ces éléments.

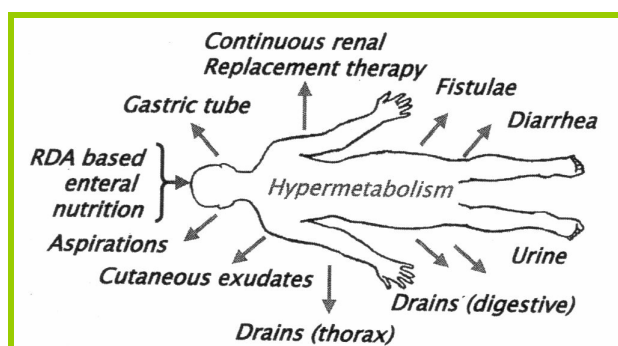


Figure 16 : Origines de la carence en micronutriments chez les patients brûlés. D'après (Berger, 2006).

**Concernant le Se**, l'équipe de Boosalis a étudié l'évolution des concentrations en sélénium sérique et urinaire chez des patients brûlés de 12% à 90% de leur surface corporelle totale. Le taux de sélénium sanguin diminue chez tous les patients et revient à la normale au bout de deux semaines chez deux patients sur vingt-trois. Cependant, l'excrétion urinaire de sélénium reste inchangée ce qui montre que la baisse du taux sérique en sélénium n'est pas due à une augmentation des pertes urinaires (Boosalis, 1986). Selmanpakoglu et al. montre également que chez des patients brûlés sur 58% de la surface corporelle totale, la concentration sérique de sélénium diminuent dès le premier jour et ce jusqu'au dixième jour (Selmanpakoglu, 1994). Les pertes cutanées et urinaires sont associées à une baisse de l'activité de la GSH-Px

et de la concentration en sélénium sérique (*Berger, 1992a*). Au niveau des tissus, le sélénium voit son taux diminuer lentement dès le premier jour.

**Concernant le Cu**, son déficit observé est particulier aux brûlés (*Berger, 1998a*). Il est dû, principalement, aux pertes cutanées par les exsudats puisqu'elles peuvent représenter jusqu'à 40% du contenu corporel total en Cu (*Berger, 1992b*). Ce déficit est corrélé à la surface cutanée brûlée (*Gosling, 1995*). De plus, cette déficience persiste durant la deuxième et la troisième semaine : le phénomène n'est donc pas dû à l'effet de dilution du liquide de réanimation (*Berger, 1995*). Le contenu urinaire en Cu augmente et persiste jusqu'à la deuxième semaine (*Berger, 1992b; Guo, 1997*).

Une étude de Guo montre que le **Fer (Fe)** sérique augmente contrairement au Zn et au Cu qui diminuent. Le Fe urinaire augmente également ainsi que le Cu alors que le calcium (Ca) et le Mg chutent. Dans cette même publication, mais sur modèle animal, les auteurs décrivent une augmentation des taux sériques de Cu, de Fe et de Ca, chez des rats déficients en zinc, ce qui souligne la difficulté d'extrapoler les résultats de l'animal à l'Homme (*Guo, 2000*).

L'aggravation des déficits en éléments-trace antioxydants entraîne la rupture de la balance antioxydant/pro-oxydant (*Berger & Shenkin, 1998a; Gamliel, 1996*) et a comme conséquence une altération des défenses anti-oxydantes au moment où elles se trouvent particulièrement sollicitées. En effet, plusieurs antioxydants endogènes sont dits essentiels, car leur statut dépend directement de l'apport nutritionnel. Parmi les éléments-trace, sont particulièrement impliqués dans la défense anti-oxydante *via* des systèmes enzymatiques métallo-dépendants, le cuivre et le zinc dans la Cu-Zn SOD, le manganèse dans la Mn SOD et le sélénium dans la GPx. Un apport adéquat de ces éléments est nécessaire à l'expression et au fonctionnement de ces enzymes. Plus récemment, le chrome a été également décrit comme antioxydant potentiel (*Anderson, 2001*). D'autres part, les vitamines antioxydantes (E, C et caroténoïdes) constituent une seconde ligne de défense. Les vitamines C et E agissent particulièrement dans le milieu extracellulaire et à proximité des membranes, alors que les SOD, les GPx et la catalase agissent principalement au niveau intracellulaire. Il apparaît donc évident qu'un déséquilibre en micronutriments, que cela soit en raison d'apports insuffisants, de pertes supérieures aux normes, d'une redistribution dans l'organisme (réponse de phase aiguë) ou de besoins accrus (anabolisme, apport exogène ou production endogène accrue d'un radical libre ou d'un oxydant donné), induit un déséquilibre du contrôle des ERO et peut précipiter des phénomènes pathologiques (*Berger, 2006*). Toutes ces conditions sont réunies chez le grand brûlé.

## 2.1.2. Statut en zinc des grands brûlés

L'évaluation du statut en Zn chez les patients brûlés est, comme pour la plupart des autres éléments-trace, délicate. La concentration plasmatique en Zn est la plus largement utilisée. 1% des 40 mmol (2.6 g) de Zn que contient l'organisme est trouvé dans l'espace intravasculaire, principalement lié à l'anhydrase carbonique dans les érythrocytes (*Ohno, 1985*). Le plasma contient 9% du Zn intravasculaire (*Milne, 1985*) ce qui correspond à une concentration normale de  $12.8 \pm 1.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  ( $0.8 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Le zinc plasmatique accessible représente, certes, une valeur faible, mais néanmoins pertinente, puisqu'elle est le résultat d'un équilibre entre les apports et les demandes.

Une altération du statut en Zn peut être liée d'une part à une augmentation des besoins ou des pertes ou à un apport insuffisant ou d'autre part à une redistribution dans d'autres compartiments tissulaires.

L'évolution du Zn plasmatique post-brûlure peut-être découpé en trois phases (**figure 17**) :

- **Phase 1**

Durant les deux premiers jours, le Zn plasmatique s'effondre jusqu'à des valeurs de  $0.2 \text{ mg.L}^{-1}$ . La chute du Zn plasmatique dépasse celle de l'albumine. Par conséquent, la diminution de l'albumine, qui est principalement due à une fuite au niveau des capillaires, ne peut pas expliquer complètement le bas niveau de Zn. Une modification de l'affinité de l'albumine pour le zinc a parfois été évoquée (*Boosalis, 1988; Giroux, 1977*).

La réponse de phase aiguë, chez les brûlés mais également chez les traumatisés, peut s'accompagner d'une hypozincémie due à une redistribution du zinc. En effet, on observe un déplacement de cet élément-trace de ses réservoirs (muscle, peau, os) vers les tissus où la prolifération cellulaire et la synthèse protéique sont intenses, en particulier le thymus, la moelle osseuse et le foie. Cette modification s'explique par l'effet de cytokines (Interleukine-1) et des radicaux libres. Le stress oxydatif consécutif aux brûlures augmente la synthèse des métallothionéines (*Ding, 2002*). Le contenu hépatique de MT s'élève suite à l'augmentation de l'expression de l'ARNm de MT-I entre 3 et 24 heures, probablement en réponse à l'augmentation des taux de peroxydations lipidiques. Par conséquent, les concentrations hépatiques de Zn augmentent à 12 heures en miroir des concentrations sériques (*Ding, 2002*).

L'augmentation de l'excrétion urinaire de Zn peut aussi expliquer la chute du Zn plasmatique. En effet, des quantités élevées d'acides aminés et d'autres substances présentes dans le sang après brûlure, peuvent chélater le Zn (*Jeejeebhoy, 1984*). Ces molécules de faible poids moléculaire peuvent traverser les glomérules rénaux, contrairement à l'albumine. En outre,

les protéines de transport habituelles du zinc sont dégradées suite à l'hypercatabolisme et aux dégâts tissulaires. Une partie du zinc urinaire peut aussi provenir de la destruction de l'anhydrase carbonique, une enzyme contenant du zinc relarguée après destruction des érythrocytes. Le Zn est fortement lié à l'anhydrase carbonique et l'affinité de l'albumine pour le Zn est plus faible. Due à son faible poids moléculaire, l'anhydrase est filtrée par le rein. Cependant, il faut garder à l'esprit que l'augmentation de l'excrétion de Zn urinaire est généralement peu présente dans les premiers jours après brûlure. Durant la première semaine, les pertes urinaires sont de l'ordre de 0,9 mg/ 24 h, ce qui est très proche des limites supérieures des valeurs de référence (10 mg/kg/24h) (*Berger, 1992b; Boosalis, 1988*). Berger et Chioléro ont évoqué une corrélation positive entre la surface brûlée et la quantité de Zn présente dans l'urine (*Berger & Chiolero, 1995*) tandis que Boosalis note une absence de corrélation entre la diminution précoce du zinc sérique et l'augmentation des pertes urinaires (*Boosalis, 1988*).

L'hypo-zincémie peut être due à des phénomènes de dilutions, puisque l'administration de fluides et la rétention sont très présentes lors de la réanimation initiale après brûlure (*Jeejeebhoy, 1984*). Cependant, la faible corrélation entre la zincémie et l'albuminémie ne permet pas d'envisager la dilution comme phénomène majeur responsable de la chute du taux plasmatique de zinc.

En 1991, Cunningham et *al.*, réalisant une étude sur le statut en Zn et Cu chez des enfants brûlés, mesure des pertes de ces éléments-trace dans les aspirations naso-gastriques impliquant une nouvelle voie de perte extracorporelle (*Cunningham, 1991*).

En 1992, suite à une analyse très méticuleuse des exsudats cutanés, Berger et *al.* mit en évidence des pertes cutanées en Zn, Cu et azote extrêmement importantes, lors de la première semaine après brûlure, dépassant substantiellement la somme des autres pertes (*Bayer-Berger, 1989; Berger, 1992b*). La moyenne de ces pertes sont de 27 mg/24h pour le Zn, de 4.7 mg/24h pour le Cu. La moyenne des pertes cutanées cumulées sur sept jours est respectivement de 190 mg et 33 mg pour le Zn et le Cu. Parallèlement, l'excrétion urinaire de Zn, certes augmentée, est, nous le rappelons, de 0,9 mg/24h. Les pertes exsudatives de Zn sont maximales durant les cinq premiers jours puis allant en diminuant, chez la plupart des patients, en particulier après les greffes de peau. Les pertes cumulées totales en Zn (peau, urine, fèces, aspirations) atteignent 210 mg au bout d'une semaine ce qui représente une part non négligeable du Zn biodisponible (5 à 10% du Zn corporel total). Les pertes cutanées restent néanmoins sous-estimées selon Berger et *al.* puisque deux périodes de fortes pertes n'ont pas été analysées – à savoir la période entre la brûlure et la prise en charge du patient (environ 17h) et la période d'hydrothérapie. La concentration en Zn dans les exsudats cicatriciels est très supérieure (facteur sept) à la concentration plasmatique (*Voruganti,*

2005). Il est difficile de savoir si ces hautes concentrations sont dues à des flux inter-compartiments ou à des mécanismes cicatriciels locaux. Cependant, le Zn étant impliqué dans le processus inflammatoire (*Tapiero, 2003a; Tapiero, 2003b*) et dans la mesure où la concentration en éléments-trace dépasse la zincémie, l'exsudat inflammatoire contribue, certes à la perte corporelle de Zn, mais aussi à une réponse inflammatoire exagérée. Le Zn ainsi utilisé est perdu à travers les plaies brûlées au lieu d'être recyclé pour d'autres fonctions corporels (synthèse de protéines, cicatrisation).

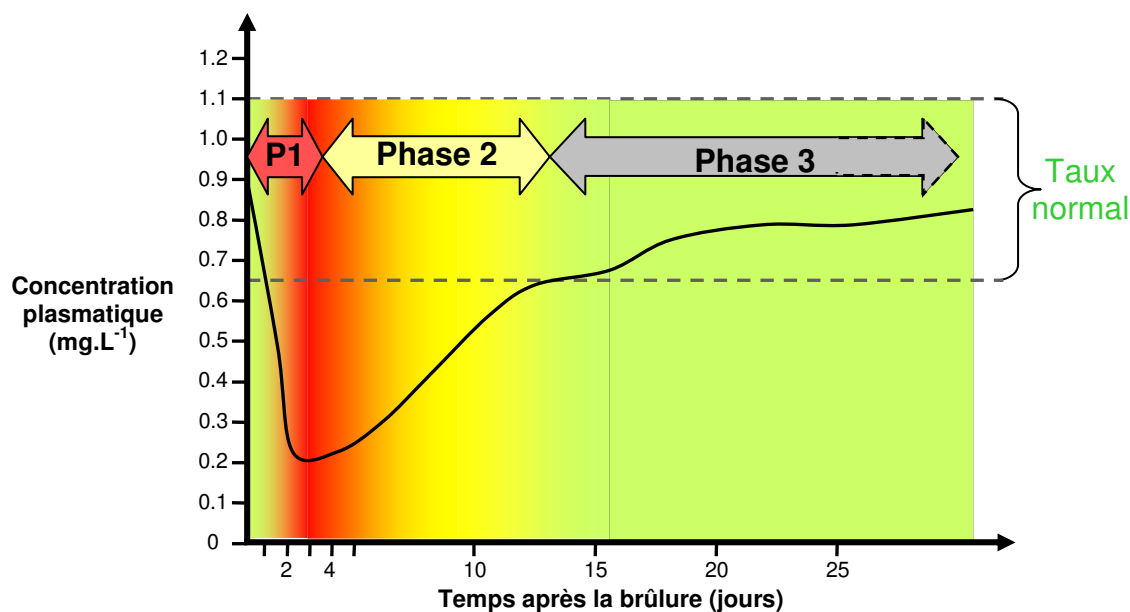


Figure 17 : Evolution théorique de la concentration en Zn plasmatique, après brûlure, chez l'Homme.

- **Phase 2**

Entre le deuxième jour et le quinzième jour d'hospitalisation, le Zn plasmatique augmente (*Berger, 1992b; Lafargue, 1976; Touillon, 1975*). Ceci est plutôt le résultat d'une redistribution du Zn vers le compartiment plasmatique. Trois sources de Zn peuvent y contribuer. Le Zn précédemment stocké dans le foie devient à nouveau disponible. Une autre partie du zinc provient de la peau et d'autres tissus correspondant à la phase clinique de répartition tissulaire. Enfin, du Zn est libéré lors de l'atrophie musculaire due à l'immobilisation des patients. Les trois sources sont quelque peu séparées dans le temps : le relargage du foie d'abord, suivi de la répartition tissulaire qui précède la dégradation musculaire.

Il est impossible de connaître la biodisponibilité du Zn sérique puisque de nombreux paramètres ne sont pas précisés – à savoir la quantité de molécules de faible poids moléculaire, l'affinité de ces molécules pour le zinc, la stabilité des complexes formés, le taux de transfert du Zn vers l'albumine, le processus d'excrétion rénale...



Le Zn plasmatique retrouve un niveau normal malgré l'augmentation marquée de la zincurie qui atteint des valeurs proches de 3 mg/ 24h, trois à quatre fois supérieures à la normale (*Boosalis, 1991; Selmanpakoglu, 1994; Shakespeare, 1982*). Il existe une corrélation entre l'augmentation de la zincurie et l'augmentation de l'excrétion d'azote urinaire reflétant l'hypercatabolisme (*Cuthbertson, 1972*) et entre la zincurie et la créatinurie (*Moser, 1985*). En effet, durant la période d'hyperzincurie, les muscles sont considérés comme étant la principale source de zinc : ils sont probablement dégradés pour participer à l'effort énergétique de l'hypermétabolisme post-brûlure et pour fournir des acides aminés lors de la synthèse des protéines de la phase aiguë. Il est intéressant de constater que les pertes urinaires en Zn sont absentes lors des premiers jours suivant la brûlure mais apparaissent, par la suite, résultant de la dégradation des protéines qui se produit lors de l'épuisement du stock de Zn libre.

Boosalis a montré une augmentation de la zincurie lors de protocoles de supplémentation (*Boosalis, 1991*). Ceci pourrait être expliqué par un excès de composés de faible poids moléculaire capable de complexer le zinc. Paradoxalement, la présence de ces composés pourrait être aussi responsable de l'augmentation de la zincémie en transférant une partie du zinc qu'ils chélatent vers l'albumine.

- **Phase 3**

A partir de la troisième semaine, deux facteurs opposés agissent sur le Zn plasmatique. La quantité de Zn relarguée par les tissus blessés et par l'atrophie musculaire diminue. D'un autre côté, un anabolisme élevé consécutif à la régénération tissulaire et à la croissance des tissus précédemment dégradés s'effectue entraînant une demande élevée en Zn disponible.

Le Zn plasmatique augmente légèrement ainsi que l'albumine. L'excrétion urinaire de Zn reste très largement supérieure à la normale et persiste pendant six à huit semaines après la brûlure (chez les patients ayant une surface corporelle brûlée supérieure à 20%) (*de Haan, 1992*).

## 2.2. Homéostasie cellulaire du zinc

L'homéostasie du zinc cellulaire repose sur un équilibre entre des systèmes d'import permettant son entrée dans la cellule (transporteurs Zip), des systèmes de sortie vers l'espace extracellulaire, le réticulum ou le compartiment vésiculaire (transporteurs ZnT) et des systèmes de stockage (les métallothionéines). L'influence de la brûlure et du statut en zinc sur ces trois systèmes a été étudiée lors de nos expérimentations.

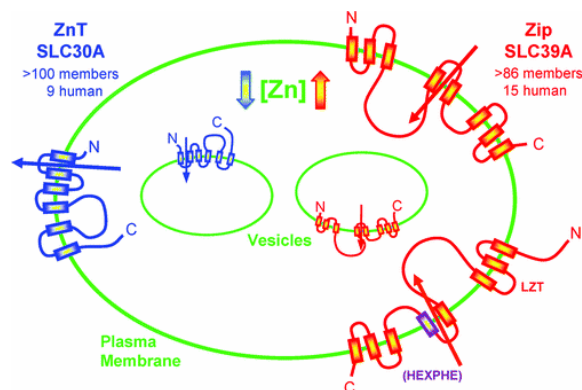
Le transport du zinc est un processus temps-, température- et pH- dépendant et il semble avoir une composante à la fois saturable et insaturable. Le zinc peut être transporté par des systèmes énergie-dépendants ou bien peut traverser les membranes comme un ion libre (*Reyes, 1996*). Jusqu'à très récemment et en dépit des nombreuses études décrivant la cinétique et les caractéristiques du transport du zinc, la connaissance des protéines et des mécanismes moléculaires impliquée dans ce processus n'était que très partielle. Des progrès substantiels furent engagés avec un clonage, en 1995, montrant une réelle activité « transporteur de zinc » de ZnT-1 (*Palmiter, 1995*).

Les transporteurs du zinc sont regroupés au sein de deux familles :

la famille ZnT ou solute-linked carrier 30 (SLC30)

la famille Zip (Zrt- et Irt-like Proteins) ou solute-linked carrier 39 (SLC39)

Les protéines ZnT et Zip ont des rôles opposés dans l'homéostasie du zinc cellulaire. Les transporteurs ZnT diminuent la concentration intracellulaire cytoplasmique en favorisant l'efflux de zinc en dehors des cellules ou vers les vésicules intracellulaires alors que les transporteurs Zip augmentent la concentration intracellulaire en zinc en favorisant le transport du zinc extracellulaire et vésiculaire vers le cytoplasme (**figure 18**) (*Eide, 2004; Palmiter, 2004*).



**Figure 18 : Représentation schématique, fonction et localisation des transporteurs de zinc Zn-T et Zip. (LZT est une sous-famille de transporteurs Zip). D'après (Liuzzi, 2004b).**

### 2.2.1. Exportation du zinc cellulaire : La famille des ZnTs

Cette famille comporte dix membres (ZnT-1 à 10) chez les mammifères. La plupart des protéines ZnT ont six domaines transmembranaires (DTMs). Les extrémités amino- et carboxy-terminales sont cytoplasmiques. De plus, les protéines ZnT ont une longue boucle riche en histidine entre les DTMs IV et V qui correspondrait au domaine de liaison au métal (Seve, 2004). Les DTMs I, II et V, hautement amphipatiques, sont très conservés. Une délétion des DTMs I et II ou de l'extrémité C- terminale annihile l'activité des transporteurs. Par conséquent, ces domaines sont indispensables au transport du zinc (figure 19) (Palmiter & Findley, 1995).

Il est possible que les ZnTs agissent aussi sous forme de dimères ou de trimères. (Bleck, 2001). Dans ce cas, les protéines semblent impliquées dans l'incorporation de zinc par les enzymes (phosphatase alcaline) en modulant son transport sous forme ionique dans la lumière de l'appareil de Golgi (Suzuki, 2005).

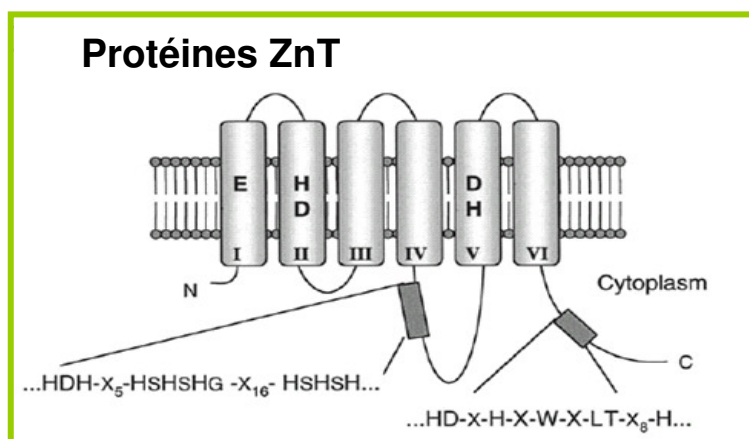


Figure 19 : Topologie du transporteur Zn-T. D'après (Eide, 2001).

Le mécanisme de transport régulé par les ZnT reste encore flou. En effet, l'expulsion cellulaire ou le dépôt vésiculaire du zinc se produit contre un gradient de concentration ; or, l'analyse des séquences ne montre pas de site de fixation pour l'adénosine triphosphate (ATP) ni de domaine adénosine triphosphatase (ATPase). Par conséquent, il est vraisemblable que les transporteurs du zinc ZnT agissent comme des transporteurs actifs secondaires ou comme antiports, selon des mécanismes comparables à ceux décrits pour des protéines homologues échangeant l'ion  $Zn^{2+}$  contre l'ion  $H^+$  ou  $K^+$  (Chao, 2004; Guffanti, 2002) ou des protéines capables de transporter le zinc sans source d'énergie ou gradient de protons dans des protéoliposomes (Bloss, 2002).

- **ZnT-1**

ZnT-1 a été le premier transporteur du zinc découvert à partir d'une banque d'ADN complémentaire de cellules de rein de rat (*Palmiter & Findley, 1995*). Sa surexpression permet la survie de cellules BHK (Baby Hamster Kidney) cultivées en présence de zinc en concentration élevée (300 µM). ZnT-1 est localisé dans la membrane plasmique et assure l'expulsion du zinc hors de la cellule.

Le gène est situé sur le chromosome 1 chez l'humain, le rat et la souris. Avec deux exons, ce gène a la structure la plus simple de la famille ZnT. Ce gène est indispensable car des souris homozygotes délétées de ZnT-1 ne sont pas viables. L'ARN messenger (ARNm) est traduit en une protéine de 507 acides aminés chez l'Homme et le rat et de 503 acides aminés chez la souris.

L'expression de l'ARNm de ZnT-1 a une large distribution tissulaire (*Liuzzi, 2001*); cependant, il est plus largement exprimé dans les tissus impliqués dans l'acquisition, le recyclage ou le transfert de zinc tels que l'intestin grêle, l'épithélium tubulaire rénal et le placenta (*Liuzzi, 2001*). En revanche, certaines cellules de ces organes, comme les cellules intestinales de la lamina propria, les cellules en gobelet ou de nombreuses cellules rénales, n'expriment pas de transcrits de ZnT-1 à des quantités détectables (*McMahon, 1998a*).

Dans l'intestin de jeunes rats mâles, des études d'immunolocalisation ont montré que ZnT-1 est plus abondant le long de la membrane basolatérale des entérocytes où il peut participer au transfert du zinc dans la circulation (*Cousins, 2000*).

Dans le rein, une orientation basolatérale de ZnT-1 est plus importante dans les cellules bordant la branche ascendante de la boucle de Henlé et le tube contourné proximal (*Cousins & McMahon, 2000*). Cette disposition suggère un rôle dans la recapture du zinc du filtrat glomérulaire. Un tel rôle pourrait expliquer les hautes capacités de réabsorption du rein par rapport à d'autres tissus (*Baer, 1984*) et le fait que les excréctions urinaires de zinc sont minimales (*King, 1994*). Notons que les systèmes responsables de la recapture du glucose et du sodium ont la même orientation.

Le promoteur de ZnT-1 contient deux éléments de réponse aux métaux (MRE pour « metal response element ») qui fixent le facteur de transcription MTF-1 (« metal responsive transcription factor 1 »), mais ne contient pas de boîte conventionnelle TATA. L'expression de ZnT-1 est induite rapidement via les éléments MRE par le zinc ou les métaux lourds tels que le cadmium (*Langmade, 2000*). Davis et *al.* ont démontré que, chez des souris surexprimant ou, au contraire, n'exprimant pas le gène de la métallothionéine, l'expression intestinale et hépatique de ZnT-1 est similaire suggérant ainsi que la concentration en

métallothionéine, protéine bien reconnue comme chélatrice du zinc, n'intervient pas dans la régulation de ZnT-1 (*Davis, 1998b*). Par contre, les deux génotypes sont influencés par une administration aiguë de zinc. Ce mode de réponse est identique à celui du gène de la métallothionéine ce qui semble indiquer que la régulation de ZnT-1 impliquait le promoteur MRE ainsi que le facteur de transcription MTF-1. Une mutation « nulle » de MTF-1 ne supprime pas complètement l'expression de ZnT-1. Par conséquent, l'expression basale de ZnT-1 peut dépendre d'autres facteurs de transcription (*Langmade, 2000*).

La régulation de l'efflux du zinc par les cellules est un des mécanismes qui permet une homéostasie du zinc cellulaire : le zinc est conservé lors d'apports diminués ou alors, le zinc est relargué lors d'apports élevés. Dans des cellules cultivées avec des milieux déplétés en métaux, les taux d'ARNm de ZnT-1 sont réduits, et augmentent de 30 fois après induction par le zinc ou le cadmium. McMahon et Cousins démontrent, chez le rat, qu'un régime en zinc élevé (180 mg /kg) augmente l'expression de ZnT-1 comparé au régime normal (30 mg /kg). Par contre, un apport insuffisant (5 mg/kg) ne semble pas modifier son expression (*McMahon, 1998b*). De plus, des travaux montrent que l'ARNm de ZnT-1 est augmenté après une ischémie cérébrale transitoire chez la gerbille (*Tsuda, 1997*). Cette augmentation de ZnT-1 est à mettre en relation avec la mort neuronale, un phénomène qui suit une augmentation importante du zinc intracellulaire dans les cellules (*Koh, 1996*). Cette surexpression de ZnT-1 pourrait être un mécanisme de défense contre la mort neuronale induite par le zinc après un accident ischémique. Par conséquent, le rôle majeur de ZnT-1 semble être la protection cellulaire contre les dommages induits par de fortes quantités de zinc intracellulaire.

- **ZnT-4**

ZnT-4 est localisé sur le chromosome murin 2 et sur le chromosome 15 humain. Huang et Gitscher ont isolé en 1997 la séquence ZnT-4 chez la souris (*Huang, 1997*). La séquence de ZnT-4 partage une homologie de 67 et 62 % avec respectivement ZnT-2 et ZnT-3. Le gène encode une protéine de 429 acides aminés qui possède un motif en « leucine-zipper » en plus de la typologie habituelle des ZnT. La surexpression de ZnT-4 chez une levure mutante *Azrc1*, qui possède un transporteur du zinc ZRC1 défectueux, permet de récupérer une croissance en milieu concentré en zinc (*Huang & Gitschier, 1997*). Par conséquent, la fonction de transporteur du zinc de ZnT-4 a été démontrée.

ZnT-4 est très abondant dans les glandes mammaires. Mais le gène est aussi exprimé dans le cerveau, le rein et l'intestin grêle (*Huang & Gitschier, 1997; Liuzzi & Cousins, 2004b; Michalczyk, 2002; Ranaldi, 2002*). Ce transporteur a été localisé dans les vésicules

intracytoplasmiques et dans l'appareil de Golgi de cellules NRK (Normal Rat Kidney) et dans les cellules alvéolaires de glandes mammaires de rates « allaitantes ». ZnT-4 suit un profil de distribution au cours de la lactation similaire à celui de la  $\beta$ -caséine et de la lactoferrine indiquant que ZnT-4 est associé aux vésicules contenant le lait (*Liuzzi, 2003*). Dans l'intestin grêle, ZnT-4 est exprimée au niveau des villosités, mais est absente des cellules en prolifération de la crypte. Ce transporteur joue donc un rôle dans l'absorption intestinale du zinc.

La régulation de ZnT-4 n'a pas été étudiée de manière précise. Dans le foie, l'intestin et le rein de rat, l'ARNm de ZnT-4 semble insensible à des changements d'apport en zinc. Cependant, une carence en zinc entraîne une augmentation de ZnT-4 dans la glande mammaire (*Kelleher, 2002*). De plus, on assiste à une localisation cytoplasmique plutôt que péri-nucléaire de ZnT-4, dans les cellules NRK, en milieu hautement concentré en zinc.

- **Les autres transporteurs ZnT**

ZnT-2 : ZnT-2 a été isolé par la méthode utilisée pour ZnT-1. Le gène humain se situe également sur le chromosome 1 alors qu'il se situe, chez le rat, sur le chromosome 4 et code pour une protéine de structure équivalente à celle de ZnT-1. Chez le rat, le gène code pour une protéine de 359 acides aminés et partage seulement 26 % d'homologie avec ZnT-1. Chez l'Homme, le gène produit, en raison d'un épissage alternatif, deux tailles de transcrits : la forme « a » a 8 exons et encode une protéine de 383 acides aminés ; la forme « b » possède 7 exons et encode une protéine de 334 acides aminés.

Le transporteur ZnT-2 a été mis en évidence dans l'intestin grêle, le rein, le pancréas, le placenta, les glandes mammaires et les testicules (*Clifford, 2000; Kelleher & Lonnerdal, 2002; Liuzzi, 2001; Liuzzi, 2003; Palmiter, 1996a*). A l'instar de ZnT-1, ZnT-2 confère une résistance similaire au zinc dans les cellules BHK quand il est surexprimé. Cependant, dans ce cas, la viabilité cellulaire, en milieu hautement concentré en zinc, est obtenue grâce à la séquestration du zinc dans des vésicules acides (*Palmiter, 1996a*). En effet, des études en fluorescence ont montré la présence de ZnT-2 dans la paroi des vésicules.

L'expression de ZnT-2 dans l'intestin grêle et le rein sont hautement sensibles aux variations du zinc (*Liuzzi, 2001*). Une déficience en zinc réduit l'ARNm de ZnT-2 à des niveaux quasiment indétectables. Au contraire, un apport en zinc (régime de deux semaines ou gavage en une seule fois) induit une production accrue de l'ARNm de ZnT-2. Etonnamment, l'ARNm de ZnT-2, qui, en temps normal, n'est pas détectable dans le foie de rat, est hautement exprimé après une prise orale de zinc. La localisation de ZnT-2 au niveau des

entérocytes des villosités intestinales, chez les rats nouveau-nés, pourrait permettre soit un stockage vésiculaire du zinc, soit une diminution de l'absorption (*Liuzzi, 2001*).

L'ensemble des observations en période de développement (accroissement transitoire de l'expression de ZnT-2), les effets protecteurs d'une surexpression de ZnT-2 et la séquestration vésiculaires de zinc suggèrent une implication de ZnT-2 lors d'une augmentation rapide de la concentration en zinc. Une telle réponse à de grandes quantités de zinc a permis d'émettre l'hypothèse que ZnT-2 pourrait participer à un mécanisme pour réguler l'implication du zinc dans l'apoptose (*Chai, 1999*).

ZnT-3 : ZnT-3 est localisé dans le cerveau (hippocampe et cortex), les testicules et le thymus (*Palmiter, 1996b*). Les niveaux d'ARNm de ZnT-3 dans le thymus ne semblent pas être sensibles à une carence modérée en zinc.

ZnT-5 : L'ARNm de ZnT-5 est hautement exprimé dans le pancréas, les ovaires, la prostate et les testicules (*Inoue, 2002; Kambe, 2002*). ZnT-5 n'a pas la même typologie que les autres ZnT : les deux types de séquences trouvées codent pour deux protéines ayant 12 ou 15 DTMs. Des études fonctionnelles n'ont pas permis de déterminer clairement si ZnT-5 agit comme les autres protéines ZnT (*Kambe, 2002*).

ZnT-6 : Contrairement aux autres membres de la famille ZnT, ZnT-6 possède, à la place de la boucle riche en histidine, une région riche en sérine. ZnT-6 est présent dans les tissus hépatiques, cérébraux et intestinaux. Les études sur les niveaux en ARNm de ZnT-6 et sur la localisation de ZnT-6 à l'état stable ne sont pas toujours cohérentes, ce qui indique que des processus non définis se produisent. Dans des cellules NRK, l'expression de ZnT-6 ne change pas face à de hauts niveaux de zinc (200µM). Dans des cellules monocytaires de lignée THP1, seules de petites réductions de l'ARNm de ZnT-6 se produisent lors d'une déplétion ou d'un excès en zinc (*Cousins, 2003*).

ZnT-7 : L'ARNm de ZnT-7 est présent de manière importante dans l'intestin et le foie, puis, en quantité décroissante, dans la rate, le rein et les poumons (*Kirschke, 2003*). Les mêmes remarques que pour ZnT-6 peuvent être formulées concernant l'expression du gène et la localisation de la protéine à l'état basal. ZnT-7 est localisé dans les vésicules péri-nucléaires. ZnT-7 permet de transporter le zinc cytoplasmique en excès vers ces vésicules. L'ARNm de ZnT-7 a une réponse « positive » vis-à-vis du zinc : c'est-à-dire une réduction en cas de déficience et une augmentation en cas d'excès.

ZnT-8 : ZnT-8 est localisé sur le chromosome humain 8 et la séquence code pour une protéine de 369 acides aminés ayant six DTMs. ZnT-8 est spécifiquement exprimé dans les cellules  $\beta$  du pancréas (*Chimienti, 2004*). Localisé au niveau de la membrane des vésicules contenant l'insuline de ces cellules, il facilite l'accumulation de zinc du cytoplasme vers ces vésicules et serait un composant majeur du processus de maturation et/ou de stockage de l'insuline au niveau des cellules  $\beta$  pancréatiques.

ZnT-9 et 10 : Peu d'informations sont disponibles concernant ces deux transporteurs. Le transporteur ZnT-9 ne semble pas être associé à la membrane plasmique ou à des microsomes. La protéine ZnT-9 serait transloquée du cytoplasme vers le noyau durant la phase S pour interagir avec des protéines mitotiques (*Sim, 2002*). Un rôle dans le transport du zinc n'a pas été établi.

### 2.2.2. Importation du zinc cellulaire : La famille Zip

La famille Zip (Zrt-/Irt-like Proteins) est composée de quatorze membres chez les mammifères. Cette famille se caractérise sur un plan structural par une prédiction de huit DTMs avec les extrémités C- et N-terminales extracellulaires. Les transporteurs Zip sont caractérisés par une longue boucle ayant un domaine riche en histidine entre les DTMs III et IV et une extrémité C-terminale très courte (*Taylor, 2003*). Un haut degré de conservation est trouvé entre les domaines IV et VIII (*Gaither, 2001a*). La cavité aqueuse, par laquelle les substrats cationiques passent, se situe entre les DTMs IV et V (*Rogers, 2000*) (**figure 20**). Comme pour les ZnTs, les protéines Zip ne contiennent pas de site de fixation pour l'ATP ni de domaine ATPase ; le transport ne nécessite donc pas d'énergie. De plus, la présence d'un gradient de sodium ou de potassium n'est pas nécessaire. Par contre, l'ion bicarbonate stimule le passage du zinc, indiquant peut-être un mécanisme de cotransport (*Gaither & Eide, 2001a*).

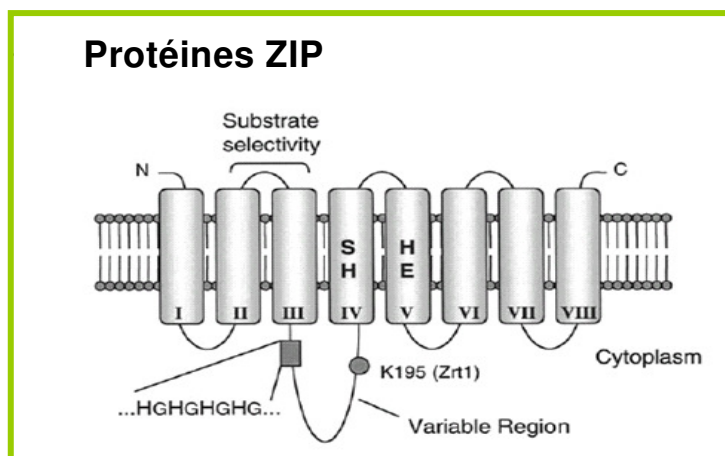


Figure 20 : Topologie du transporteur Zip. D'après (*Eide, 2001*).



- **Zip 2**

Le gène Zip2 a été isolé grâce à son homologie aux autres membres de la famille Zip (*Gaither, 2000*). Zip2 est localisé sur le chromosome 14. La séquence de référence code pour une protéine de 309 acides aminés incluant un peptide signal amino-terminal de 26 acides aminés et ayant la topologie commune de la famille Zip. L'ARNm de Zip2 est exprimé, de manière décroissante, dans le foie, la rate, l'intestin grêle et la moelle osseuse.

La surexpression de Zip2 humain ou murin dans des cellules érythroleucémiques transfectées K562 ou dans des cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney) provoque une accumulation de zinc dans les cellules (*Dufner-Beattie, 2003a; Gaither & Eide, 2000*). Des expériences de transfection et de marquage d'épitopes ont permis de localiser Zip2 au niveau de la membrane plasmique des cellules K562 indiquant que Zip2 facilite l'accumulation de zinc. L'implication de Zip2 dans l'homéostasie cellulaire zincique est renforcée par le fait qu'une déplétion en zinc induit un accroissement de l'expression de Zip2 (*Cao, 2001*). Enfin, une supplémentation en zinc entraîne un abaissement de l'expression de Zip2 (*Cousins, 2003*). Par conséquent, au vu de ses propriétés, Zip2 pourrait être, au niveau cellulaire, le pendant de ZnT-1 qui réagit de manière opposée aux variations du zinc. Cette réciprocity d'expression entre Zip2 et ZnT-1 en fait d'importants marqueurs pour évaluer l'état zincique des cellules.

- **Zip4**

Chez l'Homme, il y a deux isoformes Zip4 qui ne diffèrent que par leurs extrémités N- et C-terminales. L'isoforme la plus grande encode une protéine de 647 acides aminés avec un peptide signal N-terminal. L'autre isoforme possède 626 acides aminés.

Après des recherches initiales impliquant ZnT-4 dans l'acrodermatite entéropathique (maladie orpheline caractérisée par un déficit partiel de l'absorption intestinal du zinc qui entraîne des lésions cutanées et secondairement des infections), Zip4 fut finalement identifié comme le gène responsable de cette maladie métabolique. Plusieurs mutations (faux sens et codon stop prématuré) du gène Zip4 ont été trouvées dans l'ADN génomique de patients atteints de cette maladie (*Kury, 2002; Wang, 2002*). Ceci induit une relation définitive entre transport de zinc défectueux et physiopathologie.

L'expression humaine de Zip4 est limitée à l'intestin grêle et au rein (*Wang, 2002*). Chez la souris, l'ARNm de Zip4 est trouvé dans l'intestin grêle, le foie, l'estomac, mais pas dans le rein (*Dufner-Beattie, 2004*). La présence de transcrit de Zip4 dans la membrane vitelline laisse supposer un rôle dans le transport placentaire de zinc.

Chez des souris nourries avec un régime déficient en zinc, Zip4 est surexprimé dans l'intestin grêle alors que son expression diminue après une supplémentation en zinc (*Dufner-Beattie, 2003b*). Ces résultats suggèrent que la régulation de Zip4, dans les organes essentiels à la capture du zinc, joue un rôle dans l'homéostasie corporelle du zinc - augmentation lorsque les apports en zinc sont limités ou diminution lors d'apports élevés.

Puisque Zip2 et Zip4 sont tous les deux surexprimés en cas de déficience en zinc, un mécanisme commun de régulation est vraisemblablement responsable de cette réponse.

- **Les autres transporteurs Zip**

L'activité « transporteur de zinc » a été confirmée pour Zip1 à Zip8 et Zip14 en utilisant des expériences de transfection dans des cellules mammaliennes (HEK, K562, CHO) (*Begum, 2002; Dufner-Beattie, 2003a; Gaither, 2001b; Taylor & Nicholson, 2003; Wang, 2004a*).

Zip1 : Zip1 est présent dans de nombreux organes et glandes (*Gaither & Eide, 2001b*). Plusieurs expériences ont montré que Zip1 est un transporteur-clé dans la capture du zinc par les cellules.

Chez des souris en gestation, l'expression de l'ARNm de Zip1 ne semble pas affectée par une déficience en zinc (*Dufner-Beattie, 2003a*). Zip1 est aussi exprimé dans les cellules THP1 où seules des variations très légères apparaissent à la suite de déplétion ou de supplémentation en zinc.

Zip3 : Une surexpression de l'ARNm de Zip3 entraîne, de la même manière que Zip1 et Zip2, l'accumulation de zinc dans des cellules HEK293. Cependant, la spécificité de Zip3 pour le zinc serait moins importante que celle reportée chez Zip1 et Zip2. L'ARNm de Zip3 est principalement exprimé dans la moelle osseuse et la rate ; une faible expression est trouvée dans l'intestin grêle et le foie. Enfin, une déficience en zinc ne semble pas affecter l'expression de l'ARNm dans l'intestin grêle et la membrane vitelline chez des souris gestantes (*Dufner-Beattie, 2003a*).

Zip6 : Zip6 a été révélé comme un gène dont l'expression est stimulée par les œstrogènes dans des cellules cancéreuses de seins (*Manning, 1988*). Il est principalement exprimé dans la prostate, le placenta et les cellules des glandes mammaires (*Taylor & Nicholson, 2003*).

Zip14 a montré une capacité à transporter à la fois le zinc et le fer non lié à la transferrine.

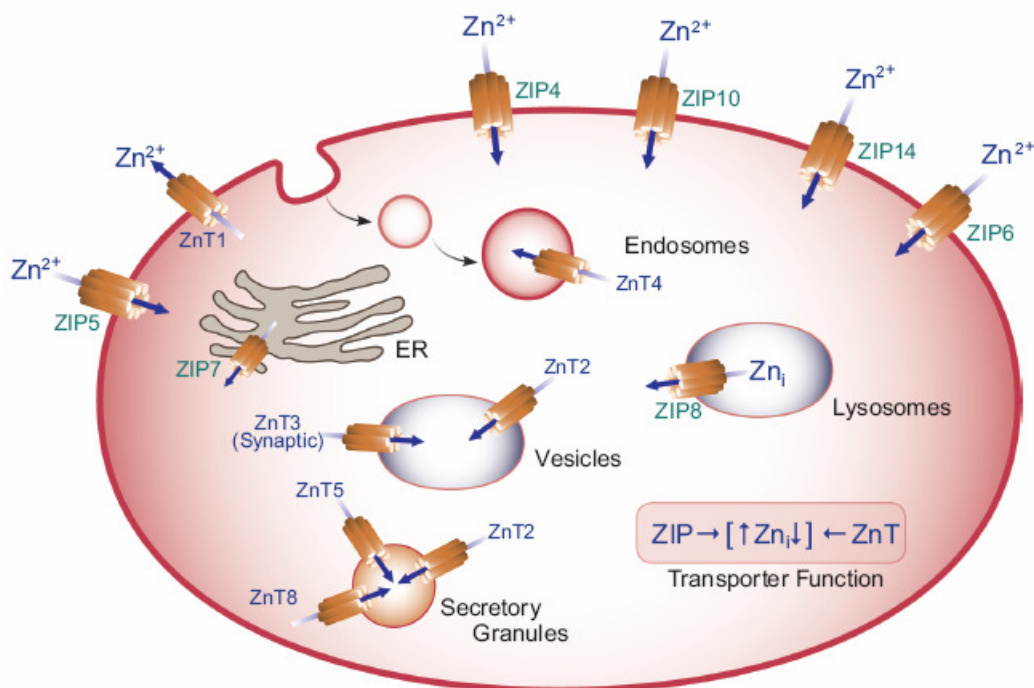


Figure 21 : Localisation cellulaire des principaux transporteurs du Zn. D'après (Lichten, 2009). Le nombre de domaines transmembranaires a été respecté. La localisation des transporteurs non représentés n'est pas encore précisément connue. ER : réticulum endoplasmique.

### 2.2.3. Les métallothionéines

Les métallothionéines (MT) sont ubiquitaires dans le règne animal. La majeure partie des tissus n'exprime que deux isoformes désignées MT-I et MT-II. L'expression de l'isoforme MT-III est spécifique au cerveau (Palmiter, 1992) et la protéine MT-IV est cantonnée à certains épithéliums squameux (Quaife, 1994).

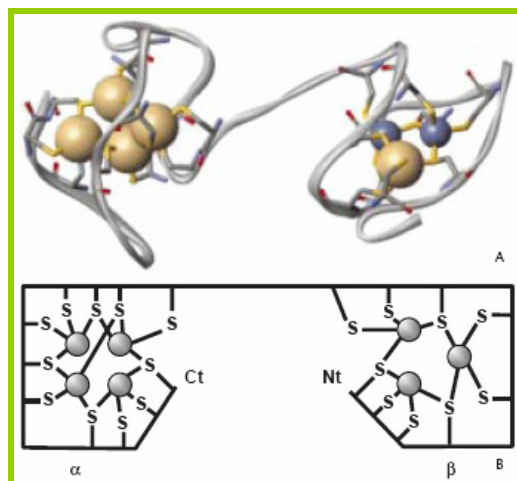
Les gènes des métallothionéines sont situés, sur le chromosome 8 chez la souris, sur le chromosome 19 chez le rat et sur le chromosome 16 chez l'Homme. Il existe chez l'Homme au moins dix gènes codant pour les métallothionéines.

Les métallothionéines sont regroupées au sein d'une super-famille de protéines possédant des caractéristiques communes :

- Faible poids moléculaire
- Teneur importante en métal
- Composition riche en cystéine (30% des acides aminés)
- Absence d'acides aminés aromatiques et d'histidine
- Séquence d'acides aminés type « cystéine – X – cystéine » (Poutney, 1995).

Le poids moléculaire des métallothionéines est de 6000 Da. Elles sont constituées d'une chaîne polypeptidique de 61 acides aminés dont 20 cystéines. La chaîne polypeptidique forme

deux domaines globulaires nommés  $\alpha$  et  $\beta$ . Les métallothionéines peuvent lier jusqu'à sept ions métalliques divalents (quatre atomes de zinc pour la sous-unité  $\alpha$  et trois atomes pour la sous-unité  $\beta$ ) grâce à des complexes de coordination thiol / métal. Les cystéines permettant les liaisons avec les ions métalliques sont regroupées en motifs Cys –X – Cys ou Cys – Cys hautement conservés au cours de l'évolution. (Figure 22)



**Figure 22 : Structure des métallothionéines.**

**A. Modèle de métallothionéine comportant cinq atomes de cadmium et deux atomes de zinc.**

**B. Représentation schématique indiquant les liaisons de coordination entre les différents atomes métalliques et les cystéines des métallothionéines. D'après (Seve, 2002).**

### 2.2.3.1. Synthèse

La synthèse des métallothionéines se produit préférentiellement au niveau hépatique. Cependant, quasiment toutes les autres cellules sont capables de produire cette protéine (Harley, 1989; Pauwels, 1994). L'expression des métallothionéines est influencée par une grande variété de stimulus incluant les métaux lourds, les cytokines pro-inflammatoires, les radicaux libres, etc. (Erreur ! Source du renvoi introuvable. III)

Il existe, bien sûr, en fonction du tissu ou du type cellulaire, une plus ou moins grande spécificité vis-à-vis des ces nombreux agents inducteurs. La métabolisation des métallothionéines est très variable et dépend du type de métal lié. De plus, un même métal montre des différences dans sa capacité à induire les métallothionéines selon les tissus (Durnam, 1981). Cela démontre que l'interaction « métal - tissu » est importante dans la régulation de la synthèse des MT. On comprendra dans interaction métal / tissu :

- La capacité du tissu à capter un métal particulier à partir de la circulation systémique
- L'accessibilité de ces différents métaux aux facteurs de régulation intracellulaires
- L'induction des gènes de la MT dans les cellules

Certains de ces métaux agiraient de manière indirecte en déplaçant, par exemple, le zinc des MT ; ce zinc devenant libre irait induire la néo-synthèse de MT.

Tableau V : Agents inducteurs de la métallothionéine

<b>Ions métalliques</b>	Cd, Zn, Cu, Hg, Au, Ag, Co, Ni, Bi
<b>Hormones et seconds messagers</b>	Glucocorticoïdes, progestérone, œstrogènes, catécholamines, glucagon, angiotensine II, AMPc, Diacyl-glycérol, calcium
<b>Facteurs de croissance</b>	Insuline, IGF-1, EGF
<b>Cytokines et agents pro-inflammatoires</b>	IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , LPS, dextran, endotoxine
<b>Vitamines</b>	acide ascorbique, acide rétinoïque, dérivé dihydroxylé de la vitamine D3
<b>Antibiotiques</b>	Streptozotocine, cycloheximide, mitomycine
<b>Agents cytotoxiques</b>	Hydrocarbures, éthanol, isopropanol, formaldéhyde, butyrate, chloroforme, tétrachlorure de carbone, bromobenzène, iodoacétate, uréthane, éthionine, diethyldithiocarbamate, pénicillamine, EDTA, indométacine...
<b>conditions induisant un stress physiologique</b>	infection, inflammation, laparotomie, radiation ionisante et non ionisante

La régulation des gènes codant pour la MT est effectuée par plusieurs MRE se situant en amont du gène de structure. Le fait de posséder plusieurs séquences de régulation permet l'intervention de nombreux facteurs de transcription agissant, entre eux, de manière coopérative ou antagoniste, sur l'induction de la synthèse des MTs (**figure 21**). Des facteurs activés par le stress peuvent également entraîner la synthèse des MTs. Les facteurs de transcription se fixant aux MRE sont liés préférentiellement à du zinc ou à d'autres métaux et sont de trois types : MTF-1 (six doigts de zinc) (*Heuchel, 1994*), M96 (quatre doigts de zinc) et MafY (un doigt de zinc). Il est intéressant de noter que le promoteur de MT-I comporte un site de fixation de l' « Upstream Stimulator Factor » (USF) qui recouvre en partie un élément de réponse antioxydant (ARE). L'élément de réponse USF / ARE augmente l'expression basale et la réponse au stress oxydant du gène MT-I (*Li, 1998b*).

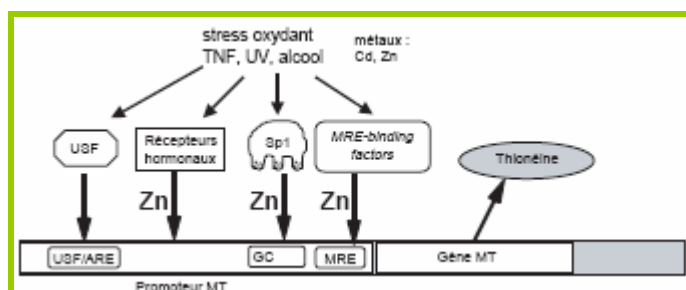


Figure 23 : Promoteur de la métallothionéine-I. L'expression, en réponse à différentes conditions de stress, est contrôlée par des facteurs de transcription liés à du Zn ou à d'autres métaux. D'après (*Seve & Favier, 2002*).

Comme nous l'avons dit précédemment, les MTs peuvent être induites dans quasiment tous les types cellulaires et tous les organes en réponse à une très grande variété de stress aussi bien physiques que chimiques. Outre les métaux lourds tels le cadmium et le plomb (*Dunn, 1987*), l'induction des MTs par des agents cytotoxiques et carcinogènes est démontrée. La synthèse des MTs pourrait être liée à la chute intracellulaire du glutathion (GSH). En effet, la déplétion partielle en GSH par des agents chimiques permet, dans certains modèles animaux, d'induire la MT au niveau hépatique (*Nakagawa, 1995*). Cette induction pourrait également être médiée par le déséquilibre de la balance anti-oxydante. *In vivo*, une induction des MTs a été démontrée dans les fibroblastes de patients irradiés par de faibles doses d'ultraviolets B (UVB). L'induction des MTs se ferait via la libération de messagers tel IL-1 par les kératinocytes basaux (*Anstey, 1996*). En effet, un certain nombre de cytokines pro-inflammatoires peuvent induire les MTs (*Cousins, 1988b*).

Il faut cependant garder à l'esprit que de nombreux stimuli différents peuvent influencer la synthèse des MTs puisqu'il existe une grande variété de motifs présents dans la séquence de régulation du promoteur de leurs gènes.

### 2.2.3.2. Fonctions physiologiques des métallothionéines

Les métallothionéines sont des protéines à rôles multiples, à l'interface entre de nombreux systèmes cellulaires impliqués dans la détoxification des métaux lourds, la régulation de l'homéostasie du zinc et du cuivre, la protection anti-oxydante, l'adaptation à différents stress physiques et chimiques, la prolifération ainsi que la différenciation, démontrant ainsi la complexité de ces différents systèmes et leurs interrelations.

- **Métallothionéine et métaux**

La fonction majeure des MTs est à mettre en relation directe avec le métabolisme des métaux car elles assurent la détoxification intracellulaire des métaux lourds (*Lazo, 1995*).

Les MTs modulent également les mouvements de cuivre et zinc. Elles se comportent comme un réservoir intracellulaire de ces métaux et contrôlèrent leur homéostasie en stockant ou en échangeant ces éléments-trace avec d'autres protéines. Ce contrôle des concentrations intracellulaires en cuivre et zinc permet aussi l'adaptation entre les apports nutritionnels et les besoins physiologiques de ces éléments-trace.

Les concentrations intracellulaires en zinc doivent être finement régulées pour permettre le fonctionnement de plus de 300 métalloenzymes à zinc dont les facteurs de transcription à doigts de zinc.

Les MTs exercent une régulation post-transcriptionnelle de l'activité de ces protéines. En effet, bien que les MTs possèdent une très forte affinité pour le zinc (constante d'affinité de  $3,2 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ ), il a été démontré qu'elles pouvaient libérer ces atomes et les échanger avec des apoenzymes (Jacob, 1998). Le processus inverse, c'est-à-dire la libération de zinc à partir des métalloprotéines, est également possible et peut être induit par les apométallothionéines (thionéines) (Jacob, 1998). C'est ainsi que les MTs pourraient réguler les échanges intracellulaires de zinc. Les thionéines, formées *in situ* lors de l'échange du zinc des MTs vers d'autres protéines pourraient assurer le même type de fonction en activant un groupe d'enzymes pour lesquelles le zinc est lié à un site inhibiteur (Maret, 1999). L'inhibition par les thionéines d'enzymes à zinc est un processus nécessitant la coopération du GSH qui jouerait alors le rôle d'intermédiaire pour le mouvement de zinc.

En effet, le potentiel redox module, par l'intermédiaire du couple glutathion réduit / glutathion oxydé (GSH / GSSG), le taux de transfert et le nombre final d'atomes de zinc transférés (Jiang, 1998). Le GSSG augmente de trois fois le taux de zinc transféré et permet une libération totale des sept atomes de zinc (Maret, 1994). Quant au GSH, son rôle est plus complexe. Dans le cas où les Zn-MT sont mises en contact avec une apoenzyme, un atome de zinc est transféré alors que, en présence physiologique de GSH, le transfert est totalement inhibé. Cependant, un apport de GSSG en plus du GSH entraîne la libération du métal (Jiang, 1998). Ces données permettent d'expliquer la régulation extrêmement fine des mouvements intracellulaires de zinc. Cet élément-trace étant inerte d'un point de vue oxydoréduction, c'est sa fixation sur les groupements thiols des MTs qui permet à la cellule de réguler ses mouvements intracellulaires. Lorsque le potentiel redox cellulaire est élevé, le zinc est lié aux MTs. Lors d'une chute de ce potentiel, c'est-à-dire une augmentation du GSSG par rapport au GSH, la libération du zinc est fortement facilitée.

- **Fonction anti-oxydante**

Les métallothionéines participent à la protection intracellulaire contre les espèces réactives de l'oxygène (Kondoh, 2001). L'activité piègeur de chaque résidu cystéine des MTs serait 38,5 fois plus efficace que le résidu cystéine du GSH dans la protection de l'ADN vis-à-vis de l'attaque par le radical hydroxyl HO<sup>•</sup> (Abel, 1989). *In vivo*, l'effet protecteur des MTs vis-à-vis des lésions oxydatives de l'ADN induites par le peroxyde d'hydrogène est également démontré (Chubatsu, 1993). Cette notion de protection de l'ADN suggère l'existence d'un pool nucléaire de MTs. Ainsi, elles seraient un des antioxydants les plus importants du noyau, ce dernier étant dépourvu d'enzymes antioxydantes de type catalase et superoxyde dismutases.



Des mutations induites par d'autres types d'ERO (radical superoxyde, oxyde nitrique, radicaux peroxyde...) sont également inhibées par les MTs (*Rossmann, 1998*). Cheng et Tang montrent que l'addition de MTs dans le liquide de perfusion de cœurs de rats ischémiés diminue la production de radicaux libres lors de la reperfusion et diminue la mort cellulaire (*Cheng, 1990*).

L'effet antioxydant des MTs est également démontré vis-à-vis de la peroxydation des lipides membranaires induite par le système xanthine / xanthine oxydase (*Markant, 1996*).

Au niveau cutané, les MTs entraînent une résistance accrue face à la phototoxicité des rayonnements ultraviolets A (UVA) (*Dudek, 1993*) (*Dudek 1993*) et UVB (*Wang, 2004b*). Des études d'immunohistochimie permettent de localiser la MT au niveau épidermique (kératinocytes basaux, kératinocytes granulaires, mélanocytes) alors que le derme n'en exprime pas (*Anstey, 1996*). Cette localisation tissulaire particulière suggère un rôle important des MTs dans la photoprotection.

Enfin, ces protéines auraient un effet antioxydant indirect en séquestrant l'ion  $\text{Cu}^+$ .

- **Métallothionéine et brûlure**

Une augmentation de l'expression de MT-I/II dans les kératinocytes simultanée à la réépithélialisation indique un rôle de MT-I/II dans la cicatrisation. Une expérience *in vitro* d'apport exogène de MT-IIA sur des kératinocytes augmente la viabilité cellulaire, diminue l'apoptose et promeut la migration des kératinocytes (*Morellini, 2008*). Ces propriétés sont très souhaitables pour déclencher une réparation rapide des lésions cutanées. Après brûlure, une application locale de MTs améliore considérablement la viabilité cutanée des tissus brûlés, augmente la consommation d' $\text{O}_2$  et l'activité de la succinate déshydrogénase et diminue le nombre de base de Schiff ainsi que le temps moyen de cicatrisation (*Yu, 1999*).

Il a été démontré, chez des rats brûlés recevant un régime contenant différentes concentrations de zinc (4, 10 et 80  $\mu\text{g/g}$ ), qu'une corrélation existe, dans le foie, entre la concentration de zinc et de MTs (*Li, 1999*). Un apport de MTs, chez des rats brûlés sur 30% SC, permet, d'une part, d'éviter des liaisons au niveau des membranes des érythrocytes et, d'autre part, de piéger des ERO en excès puisque la concentration en SOD est considérablement améliorée (*Qin, 2002*). Chen et *al.* montre également le bénéfice d'un traitement avec MTs de rats brûlés : diminution du taux de MDA, amélioration des paramètres biochimiques du sang et de l'activité de la SOD. Dans cette étude, un traitement avec de la vitamine C apporte de moins bons résultats que la MT (*Chen, 2001*). Une amélioration d'autres paramètres antioxydants de rats brûlés (GSH, GPx, GRase, vitamine E), après injection de MT, est prouvée par Zhou et *al.* (*Zhou, 2003*). En 2002, Ding et *al.* décrit, pour la première fois, une surexpression de



l'ARNm de MT-I dans le foie de rats brûlés (*Ding, 2002*). Cette surexpression est stimulée par le stress oxydant, l'accumulation de Zn hépatique, les cytokines et les glucocorticoïdes et reflète, ainsi, la mise en place d'un important système compensatoire de défense antioxydant. Une pré-induction de MTs par injection de chlorure de calcium (un inducteur connu de MT) ne protège pas des effets létaux et toxiques (destruction de la moelle osseuse, leucopénie) d'une brûlure combinée thermique et par irradiation (*Budagov, 2001*). *Khlopovskaya et al.* suggère une implication de MT dans la régulation de l'activité des macrophages après brûlure combinée (ébouillement et irradiation) (*Khlopovskaya, 1997*).

### 2.3. Intérêts de la correction des déficits par un apport thérapeutique

Les besoins en zinc sont de l'ordre de 15 mg/j (*Drueke, 1986*). Ces recommandations semblent couvrir les besoins de la population mais ne prennent pas en compte des adaptations métaboliques (augmentation de l'absorption ou au contraire situation de déplétion). Des apports conseillés pour la population française ont été établis récemment. Ils sont à moduler en fonction d'un apport alimentaire pauvre en protéines (augmentation de 30 %) ou au contraire riche en protéines (diminution de 30 %) (**tableau V** Erreur ! Source du renvoi introuvable.) (*Martin, 2001*).

**Tableau VI : Apports recommandés en zinc. D'après (*Martin, 2001*).**

Personne âgée	> 75ans	12 mg
Adulte	Homme	12 mg
	Femme	10 mg
	Femme enceinte	14 mg
	Femme allaitante	19 mg
Adolescente	13-19 ans	10 mg
Adolescent	13-19 ans	13 mg
Enfant	10-12 ans	12 mg
	7-9 ans	9 mg
	4-6 ans	7 mg
	1-3 ans	6 mg

La teneur en zinc de l'alimentation n'est pas en rapport avec la valeur alimentaire de la forme sous laquelle il s'y trouve. Ainsi, les céréales sont, elles, riches en zinc, mais un régime à base de pain complet provoque des carences en zinc, en raison des effets chélateurs puissants du phytate et des fibres végétales du blé (*Oberleas, 1976; Reinhold, 1976*). La

supplémentation en cuivre ou en fer non héminique ainsi que des doses pharmacologiques de calcium peuvent entraîner un effet compétitif sur l'absorption de zinc. Les apports calculés ou mesurés sont inférieurs aux besoins théoriques pour la plupart des études ; en France, les estimations des apports sont en moyenne de 10 mg/j chez les hommes et de 8 mg/j chez la femme (*Pelus, 1996*) (**tableau VI**). Aussi, malgré une adaptation de sa muqueuse intestinale à ce bas niveau d'apport, l'Homme est très sensible aux carences en zinc.

**Tableau VII : Apports mesurés chez l'adulte en mg**

11	( <i>Osis, 1972</i> )
8,6	( <i>Holden, 1979</i> )
10	( <i>Gibson, 1982</i> )
10,6	( <i>Schelenz, 1985</i> )
7,7 (femme)	( <i>Abdulla, 1986</i> )
8,9 (homme)	( <i>Abdulla, 1986</i> )
10,5	( <i>Pelus, 1996</i> )
14,4	( <i>Biego, 1998</i> )
10,2	( <i>Noel, 2003</i> )
8,7	( <i>Leblanc, 2005</i> )

Les carences alimentaires en zinc sont largement répandues à travers le monde affectant plus de un milliard de personnes (*Sandstead, 1991*). Elles s'observent le plus souvent dans les pays en voie de développement et chez les végétariens où les principales sources de protéines sont les céréales ; en effet, leurs fortes teneurs en phosphates et en phytates, de puissants chélateurs, diminuent la biodisponibilité de cet élément métallique (*Lonnerdal, 2000*). Des régimes à haute teneur en phytates sont associés à un statut en zinc diminué (*Manary, 2002*). Dans le « rapport sur la santé mondiale 2002 » (*WHO, 2002b*), la déficience en zinc est identifiée comme l'un des douze principaux facteurs à risques de décès prématurés dans les pays en voie de développement. Toutefois, il convient de souligner que des carences en zinc sont aussi diagnostiquées dans les pays développés où des apports inférieurs à 20 % aux apports recommandés sont courants (*Pennington, 1996*). C'est dans les segments de la population qui ont les plus grands besoins en zinc (les nourrissons, les femmes enceintes, les adolescents) que la probabilité d'une carence en zinc est la plus élevée. Certaines habitudes alimentaires, comme nous l'avons cité ci-dessus, certains médicaments comme les antibiotiques, les anti-inflammatoires ou les diurétiques et certaines maladies (maladie de Crohn, diarrhée, mucoviscidose, diabète de type 1, thalassémie, drépanocytose...) entraînent une perte en zinc. L'alcool ainsi que des cures trop longues de fer ou de cuivre gênent l'absorption du zinc. En France, 7 % de la population seraient déficients en zinc (*Sabatier, 2008*). Une étude de *Preziozi et al.*, portant sur les effets d'une supplémentation combinée en

éléments-trace et en vitamines antioxydantes chez des sujets sains, met en évidence, avant le début de l'étude, une concentration sérique en zinc basse ( $< 10,7 \mu\text{mol/L}$ ) chez 15,1 % des hommes et 23,8 % des femmes (*Preziosi, 1998*). Les femmes jeunes représentent un groupe dont les apports en zinc sont bas. Chez le sujet âgé institutionnalisé, les déficits d'apports sont également fréquents (*Schmuck, 1996*). En France, la proportion des individus, dont les apports sont inférieurs au seuil limite d'apports, est estimée à 2,6% chez les adultes et à 0,9 % chez les enfants (3 à 14 ans). A l'opposé, la proportion des individus, dont les apports sont supérieurs au seuil toxicologique de référence, est estimée entre 0 et 2 % chez l'adulte et l'enfant (*Leblanc, 2005*).

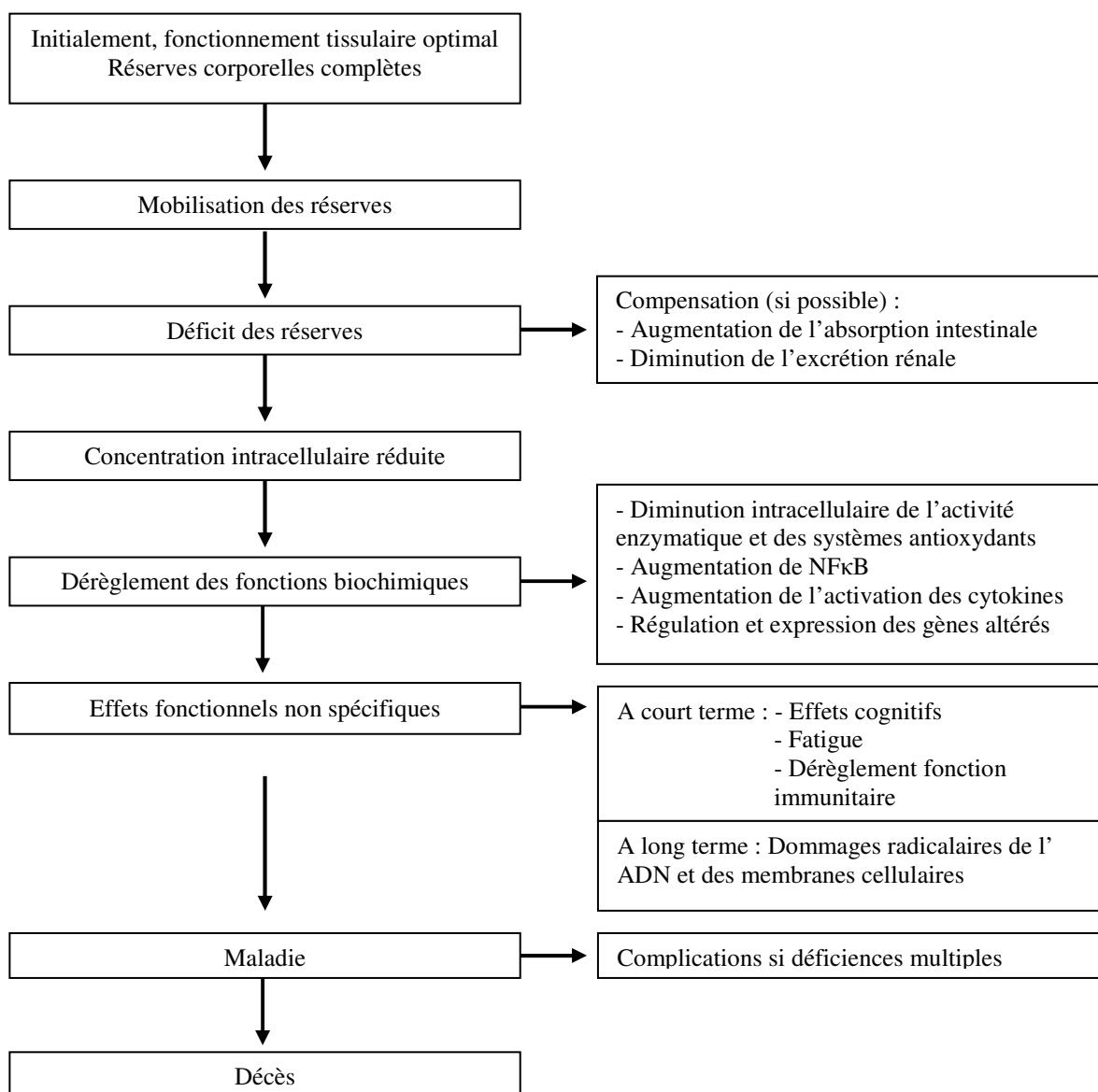
Les signes cliniques d'une carence en Zn (**tableau VII**) entraînent des troubles allant de taches ou de stries blanches sur les ongles, d'une peau sèche, d'une chute de cheveux, lors d'une carence légère, à des symptômes généraux, lors d'une carence plus sévère, tels que retard de croissance, hypogonadisme, anorexie, léthargie, cécité nocturne, retard de cicatrisation, affaiblissement du système immunitaire.

**Tableau VIII: Manifestations cliniques d'une déficience en zinc**

Retard de croissance	Avortement spontané – grossesse avant terme
Hypogonadisme	Perte de poids
Infections récurrentes	Anorexie
Réponse immunitaire altérée	Diarrhée
Retard de cicatrisation	Alopécie
Oligospermie	Léthargie
Cécité nocturne	Changements cutanés
Complications durant l'accouchement	Anomalies du goût
Spina bifida	Désordres émotionnels

Dans les tableaux pathologiques, lors du développement de l'état de déficience, le patient passe par une série d'étapes (**figure 24**). Initialement, le déficit d'un compartiment tissulaire est compensé par une augmentation de l'absorption intestinale ou par une diminution de l'excrétion lorsque ces processus sont possibles. Cette étape est suivie par une période de diminution de la concentration intracellulaire menant à un dérèglement de fonctions biochimiques. Cette étape peut déboucher sur une période de défauts fonctionnels non spécifiques au niveau du métabolisme, du système immunitaire, de certaines fonctions cognitives. La dernière étape est la mise en place d'un état de déficience clinique caractéristique. Cependant, chez les grands brûlés, les signes d'une subdéficience en éléments-trace ne sont pas toujours évidents à détecter. Une grande partie du challenge est donc d'éviter le développement de cette subdéficience afin d'empêcher sa progression vers des états plus sévères.

Le zinc étant impliqué dans la plupart des voies métaboliques, le déficit en cet élément-trace a de rapides effets préjudiciables chez le grand brûlé. Une déficience en zinc produit une augmentation de la consommation d'énergie pour maintenir le poids corporel, une altération des muqueuses, une réduction de la cicatrisation et une diminution de l'immunité cellulaire associée à une augmentation de la mortalité par infections (*Baer, 1985; Chandra, 1997; Jeejeebhoy, 1984*).



**Figure 24 : Conséquence d'un déficit en vitamines et éléments-trace en cas de maladie grave. D'après (Shenkin, 2000).**

La supplémentation précoce en zinc, pour permettre une distribution aux tissus principaux, pour diminuer les dommages aux organes liés au stress oxydant et pour prévenir le développement d'un déficit aigu, apparaît être plus qu'une théorie. Il y a suffisamment de preuves des bénéfices d'une supplémentation en zinc et en éléments-trace pour justifier son introduction en pratique courante et pour encourager les essais expérimentaux et cliniques de supplémentation.

Cependant, les études concernant les effets d'une supplémentation en zinc, après brûlures, sont relativement peu abondantes :

- Chez le rat, la supplémentation en Zn améliore la cicatrisation (*Li, 1998a*).
- En 1979, chez des enfants, une supplémentation, par voie orale, en Zn et Cu n'a pas corrigé le déficit. Ceci était dû à la compétition pour l'absorption entre le Zn et le Cu, au niveau des muqueuses (*Pochon, 1979*).
- En 1994, chez des patients brûlés ( $41 \pm 9\%$  SC), un apport accru en Cu (4,5 mg/j) en Se (190 µg/j) et en Zn (40 mg/j) permet d'augmenter les taux sériques et les neutrophiles et diminue le temps d'hospitalisation (*Berger, 1994*).
- En 1995, chez des patients brûlés ( $37 \pm 11\%$  SC), l'excrétion urinaire de malondialdéhyde (MDA), corrélée à la sévérité de la brûlure, semble diminuée par la supplémentation en Zn (30 mg/j), Se (161 µg/j) et Cu (3,6 mg/j) (*Berger & Chiolo, 1995*).
- En 1998, chez des patients brûlés ( $48 \pm 17\%$  SC), une supplémentation en Zn (38 mg/j), Cu (4,6 mg/j) et Se (297 µg/j), pendant les huit premiers jours après brûlure, entraîne un retour à la normale du taux plasmatique de Se et de GPx, une réduction d'IL-6 et de l'excrétion urinaire de MDA et surtout une diminution de la durée d'hospitalisation et des pneumonies nosocomiales de 65% (*Berger, 1998b*).
- En 2005, chez des enfants brûlés (>40% SC), des suppléments en Zn et en Cu triplés par rapport aux « Dietary References Intakes » (DRI) sont insuffisantes pour restaurer leurs taux plasmatiques (*Voruganti, 2005*).
- En 2007, chez des patients brûlés ( $45 \pm 21\%$  SC), une supplémentation en Zn, Cu et Se a été donnée en intraveineuse entre le jour 14 et le jour 21 après brûlure. Elle a permis une augmentation des concentrations plasmatiques et tissulaires en Se et Zn, une amélioration du statut antioxydant et de la prise des greffes et, enfin, une diminution des infections pulmonaires (*Berger, 2007*).

## 2.4. Problèmes posés par la supplémentation

Les conséquences d'une carence en zinc sont connues et étudiées depuis des années. Cependant, peu d'attention a été portée sur les éventuelles conséquences d'un apport excessif en zinc. De plus, de nombreuses publications indiquent la relative non toxicité du zinc et la tolérance considérable des mammifères, incluant l'Homme, aux apports élevés en zinc (*Hambidge, 1986*). Il est vrai que l'apparition des symptômes d'intoxication requiert l'ingestion d'une grande quantité de zinc. Mais l'utilisation d'apports en zinc, même à un niveau relativement bas, serait susceptible d'avoir, dans certains cas, des conséquences défavorables. Nous allons examiner ces conséquences au travers de trois types d'apports :

- Les apports suffisants pour induire une toxicité
- Les apports utilisés en traitement pharmacologique (100 à 300 mg de Zn/j)
- Les apports communément utilisés en complément alimentaire (15 à 100 mg de Zn/j)

### 2.4.1. Apports induisant une toxicité

#### 2.4.1.1. Toxicité aiguë

La plupart des cas sont la conséquence d'un empoisonnement alimentaire ou d'un environnement industriel « pollué ».

Concernant l'empoisonnement alimentaire, typiquement, cela provient d'aliments ou des boissons stockés pendant de longues périodes dans des récipients galvanisés. Ces derniers, légèrement acides par nature, ont lessivé suffisamment de zinc de la paroi galvanisée pour entraîner une toxicité aiguë lors de l'ingestion. Il est difficile de quantifier la quantité ingérée, mais une dose de 1 à 2 mg de ZnSO<sub>4</sub>, correspondant à 225 - 450 mg de Zn est considérée comme émétique. Les symptômes incluent nausées et vomissements, douleurs épigastriques, crampes abdominales et diarrhées (souvent hémorragiques).

Des cas de mortalité ont été rapportés chez l'Homme après inhalation de vapeurs de composés de zinc. Les décès étaient dus à une **détresse respiratoire importante** (*Hjortso, 1988*). A l'autopsie, ont été observées une **fibrose pulmonaire interstitielle et intraalvéolaire**, ainsi qu'une occlusion des artères pulmonaires. En milieu professionnel, certaines opérations comme le découpage ou la soudure d'acier galvanisé, peuvent conduire à la formation de fumées contenant des particules ultrafines d'oxyde de zinc (< 0,1 µm de diamètre). L'exposition à ces fumées peut causer ce que l'on appelle la « **fièvre des fondeurs** », caractérisée par les symptômes suivants : gorge sèche et douloureuse, toux, dyspnée, fièvre, douleurs musculaires, céphalée et goût métallique dans la bouche (*Gordon, 1992; Heydon, 1990*). Des effets cardiaques et gastrointestinaux peuvent également être

associés (Mueller, 1985). Chez des volontaires, une exposition durant 4 heures à 5 mg/m<sup>3</sup> d'oxyde de zinc a entraîné les symptômes typiques de la fièvre des fondeurs (Gordon, 1992). A noter que cette affection devient rare à l'heure actuelle (CE, 1999).

Le chlorure de zinc est classé comme corrosif par la Commission Européenne. L'application sur la peau de 1 mg ZnCl<sub>2</sub>/cm<sup>2</sup> a causé des brûlures chez la souris et le lapin (Lansdown, 1991). L'oxyde, le sulfate et le stéarate de zinc ne sont pas irritants. A noter que certaines préparations pharmaceutiques (collyres, crèmes...) et cosmétiques contiennent des composés du zinc à des concentrations allant jusqu'à 50 %.

**Tableau IX : Données toxicologiques du zinc et de ses dérivés chez les rongeurs. D'après (ATSDR, 2003; CE, 1999).**

Substance Chimique	Voie d'exposition	CL50 ou DL50	Espèce	Durée d'exposition
<b>Zinc poudre</b>	Inhalation	> 5,41 g Zn/m <sup>3</sup>	Rat	4h
<b>Chlorure de zinc ZnCl<sub>2</sub></b>	Inhalation	1,975 g ZnCl <sub>2</sub> /m <sup>3</sup> (0,947 g Zn/m <sup>3</sup> )	Rat	10 min
<b>Oxyde de zinc ZnO</b>	Inhalation	2,5 g ZnO/m <sup>3</sup> (2 g Zn/m <sup>3</sup> ) > 5,7 g ZnO/m <sup>3</sup> (4,6 g Zn/m <sup>3</sup> )	Souris Rat	Inconnue 4h
<b>Stéarate de zinc Zn(C<sub>18</sub>H<sub>35</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub></b>	Inhalation	200 g stéarate Zn/m <sup>3</sup> (20,7 g Zn/m <sup>3</sup> )	Rat	1h
<b>Zinc poudre</b>	Orale	2 g Zn/kg	Rat	
<b>Chlorure de zinc ZnCl<sub>2</sub></b>	Orale	1,26 g ZnCl <sub>2</sub> /kg (0,61 g Zn/kg) 1,1 g ZnCl <sub>2</sub> /kg (0,53 g Zn/kg)	Souris Rat	
<b>Oxyde de zinc ZnO</b>	Orale	> 7,95 g ZnO/kg (> 6,39 g Zn/kg) > 15 g ZnO/kg (> 12 g Zn/kg)	Souris Rat	
<b>Phosphate de zinc Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub></b>	Orale	> 5 g Phosphate Zn/kg *	Rat	* Type de composé (di, tétra ou hepta hydraté) non précisé
<b>Sulfate de zinc ZnSO<sub>4</sub></b>	Orale	1,891 g sulfate Zn/kg * 2,949 g sulfate Zn/kg *	Souris Rat	
<b>Stéarate de zinc</b>	Orale	> 5 g stéarate Zn/kg (> 0,5 g Zn/kg)	Rat	
<b>Acétate de zinc</b>	Orale	0,086 g Zn/kg 0,237 g Zn/kg	Souris Rat	
<b>Nitrate de zinc</b>	Orale	0,204 g Zn/kg 0,293 g Zn/kg	Souris Rat	
<b>Sulfate de zinc</b>	Cutanée	2 g sulfate Zn/kg *	Rat	
<b>Stéarate de zinc</b>	Cutanée	2 g stéarate Zn/kg (< 0,21 g Zn/kg)	Lapin	

Les composés peuvent être classés par ordre croissant de toxicité :

**Figure 25 : Toxicité des composés du zinc**



### 2.4.1.2. Toxicité chronique

- **Effets systémiques**

#### **Etudes chez l'Homme**

On connaît peu de choses sur la toxicité à long terme du zinc par inhalation. Il a été rapporté que des travailleurs dans la métallurgie présentaient une fréquence plus élevée de problèmes gastro-intestinaux. Toutefois, ces individus avaient pu être exposés à d'autres composés chimiques (arsenic, sulfure d'hydrogène). Par contre, 24 travailleurs, ayant été exposés entre 2 et 35 ans à des concentrations inférieures à 130 mg Zn/m<sup>3</sup>, ne présentaient qu'un léger dérangement abdominal occasionnel. Aucun effet hépatique ou rénal n'a été décelé chez des travailleurs exposés durant plusieurs années au zinc (*Hamdi, 1969*).

#### **Etudes chez l'animal**

Des **lésions de l'appareil respiratoire** (alvéolite, emphysème, infiltration macrophagique, fibrose) ont été observées chez des cobayes après exposition au chlorure de zinc à la dose de 199 mg de zinc/m<sup>3</sup> durant trois semaines (*Marrs, 1988*).

Par voie orale, le zinc induit des effets aux niveaux gastro-intestinal et sanguin. Des **hémorragies intestinales** ont été observées chez des furets ayant ingéré 390 mg zinc/kg/j sous forme d'oxyde durant deux semaines (*Straube, 1980*). Une diminution des taux d'hémoglobine, de l'hématocrite, du nombre d'hématies et/ou de leucocytes a été observée après ingestion de composés du zinc chez le rat, la souris (*Maita, 1981*), le lapin (*Bentley, 1991*), le chien (*Gurnee, 2007*) et le furet (*Straube, 1980*). Des souris, ingérant des microparticules de zinc durant deux semaines (5 g/kg), ont présenté, outre des troubles rénaux et hépatiques, des vomissements, des diarrhées ainsi que des perturbations hématologiques (*Wang, 2006*).

Des **lésions rénales** ont également été observées après ingestion de sulfate de zinc (1100 mg Zn/kg/j) durant 13 semaines chez la souris (*Maita, 1981*) ou d'acétate de zinc (191 mg Zn/kg/j) durant trois mois chez le rat (*Llobet, 1988*).

Enfin, des **anomalies au niveau du pancréas** ont été notées après ingestion de zinc chez le rat (0,56 g/kg/j de sulfate de zinc pendant treize semaines) (*Maita, 1981*), la souris (0,07 g/kg/j de sulfate de zinc pendant quatre mois) (*Aughey, 1977*), le furet (oxyde de zinc à 0,39 g Zn/kg durant 97 semaines) (*Straube, 1980*), le canard (2,5 g Zn/kg de sulfate de zinc durant 56 jours) (*Kazacos, 1989*) et le poulet (0,5 g Zn/kg d'oxyde de zinc) (*Lu, 1990*).



- *Effets cancérigènes*

L'Union Européenne et les Etats-Unis n'ont pas classé le zinc et ses dérivés dans les substances cancérogènes pour l'Homme.

Des études réalisées en milieu professionnel n'ont pas montré d'augmentation significative de l'incidence des cancers en relation avec l'exposition au zinc.

Par voie orale, une seule étude est disponible. L'incidence de diverses tumeurs n'a pas été augmentée chez des souris recevant 200 à 1000 mg Zn/kg/j durant 53 semaines (*Walters, 1965*).

Des études suggèrent que la croissance tumorale est retardée en cas de déficience en zinc et qu'une quantité importante de zinc ingérée peut agir comme promoteur. Ces effets peuvent s'expliquer par le fait que le zinc est nécessaire pour la synthèse de l'ADN et la réplication cellulaire.

#### 2.4.2. Apports à doses pharmacologiques

Des apports de zinc entre 100 à 300 mg par jour résultent, en général, d'une prescription médicale.

L'un des principaux problèmes survenant lors des protocoles de supplémentation en zinc est l'apparition d'une carence en cuivre du fait de la compétition entre le zinc et le cuivre, au niveau de l'absorption intestinale. Des patients, recevant 150 mg de Zn/j en raison d'une anémie falciforme, développèrent une **déficience sévère en cuivre** (*Prasad, 1978*). Le statut en cuivre fut rétabli par l'arrêt du traitement. Une femme recevant 440-660 mg ZnSO<sub>4</sub> (110-165 mg Zn) quotidiennement pendant dix mois, en raison d'ulcères aphteux de la bouche et de la langue, développa une déficience en cuivre (*Hoffman, 1988*). Des cas de prise de compléments alimentaires pendant de longues périodes (> deux ans) **entraînant leucopénie, anémie sidéroblastique, déficience en cuivre et diminution du cholestérol « high-density lipoprotein »** illustrent le danger inhérent à l'automédication (*ATSDR, 2003; Patterson, 1985; Willis, 2005*).

De façon intéressante, des volontaires, ayant ingéré du sulfate de zinc à raison de 2 mg zinc/kg/j pendant six semaines, ont présenté des **crampes d'estomac, des nausées et des vomissements** (*Samman, 1987*) – manifestations similaires aux cas d'intoxications aiguës.

Le zinc joue un rôle dans le développement et le maintien de l'intégrité du système immunitaire. Cependant, chez des volontaires sains, une dose de 300 mg de Zn par jour pendant six semaines a entraîné un **dérèglement des fonctions immunitaires** (altérations

fonctionnelles des lymphocytes et des polynucléaires sanguins) (*Chandra, 1984*). Une dose plus faible (100 mg de Zn/j) ingérée par des personnes âgées pendant trois mois n'a pas altéré les fonctions immunitaires.

Puisque des apports élevés en Zn, chez le rat, sont associés avec une augmentation du cholestérol (*klevay, 1974*), la concentration en lipoprotéines des volontaires recevant 300 mg de zinc par jour a été examinée. Une **augmentation** du cholestérol « low-density-lipoprotein » (**LDL**) et une **diminution** du cholestérol « high-density-lipoprotein » (**HDL**) a été observée, bien que les concentrations en triglycérides et en cholestérol total n'ont pas varié, de manière significative, entre le début et la fin de l'expérimentation. Des sujets recevant 160 mg de Zn durant six semaines ont également présenté une diminution du cholestérol HDL (*Hooper, 1980*).

Enfin, Piao a remarqué, chez des rats recevant 4 mg Zn/kg/j pendant sept jours, des effets délétères (perturbations du système hématopoïétique, diminution de l'alanine aminotransférase et de la triiodothyronine, augmentation du cortisol) (*Piao, 2003*).

Des conséquences néfastes sont donc susceptibles d'apparaître lors d'apports de zinc à des doses pharmacologiques, et plus particulièrement lors d'apports continus sur une longue période.

### 2.4.3. Apports légèrement supérieurs aux apports journaliers recommandés (AJR)

Plusieurs études ont montré que l'utilisation de suppléments alimentaires à base de zinc, allant de 15 mg par jour (AJR pour un adulte sain hors grossesse et lactation) à 100 mg par jour, peut entraîner des perturbations similaires à celles rencontrées lors des apports « pharmacologiques ». Sandstead a montré qu'une augmentation des quantités de zinc ingérées entraînait, en parallèle, une augmentation des quantités de cuivre nécessaires au maintien de l'homéostasie (*Sandstead, 1995*). Ces observations ont été faites à des niveaux d'apports proches des AJR. D'autres études ont aussi rapporté une augmentation des besoins et des pertes fécales en cuivre lors d'apports en zinc augmentés (*Burke, 1981; Festa, 1985*). Cependant, toutes les études n'arrivent pas à ces mêmes conclusions (*Colin, 1983; Taper, 1980*). Les raisons de ces désaccords sont liées à des différences dans les protocoles expérimentaux (âge, sexe, quantités de zinc et de cuivre dans les régimes, durée de l'étude).

Si l'excrétion et/ou les besoins en cuivre augmentent lors d'apports en zinc accrus, il est logique de supposer que l'utilisation de suppléments en zinc entraîne un **dérèglement du statut en cuivre**, à moins que ce dernier soit compensé par des apports en cuivre suffisants. Peu d'études ont abordé la question. Fischer a trouvé une **diminution de l'activité de la**

**superoxyde dismutase Cuivre/Zinc (SOD Cu/Zn)** érythrocytaire, qui est plus sensible à la déficience en cuivre que les concentrations plasmatiques en cuivre ou en céruloplasmine, chez des volontaires mâles adultes recevant deux fois par jour 25 mg de Zn pendant six semaines (*Fischer, 1984*). Des résultats similaires ont été montrés par Yadrick : une **diminution de l'hématocrite, de la ferritine sérique** et de l'activité de la SOD érythrocytaire a été notée, chez des femmes ayant reçu 50 mg Zn/j sous forme de gluconate durant dix semaines, bien que les concentrations en céruloplasmine soient restées stables. De plus, cette étude a également trouvé une apparente compétition entre le zinc et le fer avec une diminution de la ferritine sérique et de l'hématocrite (*Yadrick, 1989*).

Des **perturbations du profil en lipoprotéines sériques** sont associées à une supplémentation en zinc et/ou à un trouble du métabolisme du cuivre. Une diminution du cholestérol HDL a été observée chez des hommes consommant 50 à 75 mg Zn/j pendant douze semaines. Freeland-Graves a reporté un déclin transitoire du cholestérol HDL lors d'un apport de 100 mg/j pendant huit semaines (*Freeland-Graves, 1982*). Chez des personnes âgées consommant des suppléments faiblement dosés (30 mg Zn/j), l'arrêt du traitement fut associé à une augmentation significative du HDL, une diminution du LDL et à une amélioration du rapport HDL / LDL (*Goodwin, 1985*).

L'ingestion de larges quantités de zinc peut mener à des manifestations toxiques évidentes. Cependant, en l'absence de tels symptômes et avec des doses fréquemment consommées par le public, l'utilisation de compléments alimentaires à base de zinc peut interférer avec le métabolisme d'autres nutriments – en particulier, le cuivre – dérégler le système immunitaire et affecter le profil des lipoprotéines.

### 3. Objectifs de notre travail

Actuellement, de plus en plus de Centres de Traitement des Brûlés (CTB) supplémentent en vitamines anti-oxydantes et oligo-éléments les patients hospitalisés, bien qu'il n'existe pas de protocole normalisé. En 1987, une étude réalisée en Amérique du Nord montrait que l'utilisation des éléments-trace dans les CTB n'était pas généralisée. 90% prescrivait ou recommandaient une supplémentation en éléments-trace. Dans ce groupe, 88% prescrivait du Zn, 75% du Fe, 26% du Cr et seuls 30% recommandaient du sélénium. Vingt ans après, une étude, menée en France, par notre équipe, montre que l'apport en micronutriments antioxydants en routine, chez les grands brûlés, n'est toujours pas uniformisé dans les différents CTB. En effet, les doses administrées varient d'un facteur 35, pour le zinc. Le délai d'administration après la brûlure varie également. De plus, la moitié des CTB estiment que les spécialités mises à leur disposition ne sont pas adaptées aux besoins spécifiques des grands brûlés. Enfin, la plupart des équipes souhaitent disposer de travaux de recherche pour préciser les protocoles d'administration (Agay, 2007; Spadoni, 2007). On note l'absence récurrente de lignes directrices concernant des mesures de supplémentation en éléments-trace. Par exemple, l'ouvrage de l'association américaine de la brûlure (ABA) « American Burn Association Guidelines » n'évoque toujours pas l'utilisation des micronutriments dans son chapitre dévolu au support nutritionnel (Peck, 2001). La « Food and Drug Administration » a également révisé les quantités de vitamines à administrer lors de certains traumatismes ; cependant, aucune révision des recommandations n'a eu lieu concernant les éléments-trace (FDA, 2000).

Par conséquent, les traitements relèvent encore de l'empirisme et les preuves en leur faveur sont encore insuffisantes pour déterminer exactement la place des micronutriments antioxydants dans l'arsenal thérapeutique.

Les recherches menées dans notre laboratoire ont pour objectif d'améliorer le traitement des blessés et polytraumatisés, notamment des brûlés. Elles visent à mettre à la disposition des praticiens les outils les plus performants pour les aider dans leur mission de soin, accroître les chances de survie et la qualité de vie des grands brûlés en améliorant le traitement des complications des brûlures graves, afin que les séquelles soient les moins invalidantes possible. Comme nous l'avons précédemment décrit, l'agression thermique induit une réponse physiopathologique exacerbée (hypermétabolisme – hypercatabolisme) et le développement d'une réaction inflammatoire explosive, responsable du stress oxydant observé chez ces patients. Le stress oxydant causé par l'agression thermique nécessite une adaptation métabolique impliquant aussi une supplémentation adaptée en éléments-trace. Pour préciser les niveaux optimaux de supplémentation, notre équipe a réalisé, dans un premier temps, une exploration complète des systèmes antioxydants dans le modèle du rat brûlé non supplémenté (Agay, 2005). Puis, afin de définir la composition optimale d'un soluté de supplémentation spécifique des grands brûlés, il a été nécessaire d'étudier, de manière séparée, les différents composés du cocktail administré (cinétique, effets-doses, bénéfices, toxicologie).

Après avoir étudié l'intérêt de la supplémentation en sélénium dans le cadre d'un précédent doctorat dans notre équipe, nous nous proposons de poursuivre l'étude de l'importance des éléments-trace dans le traitement des grands brûlés en nous intéressant au zinc. Sur un modèle animal d'agression thermique, original et mis en place dans notre laboratoire, nous nous sommes intéressés aux modifications biochimiques et moléculaires du métabolisme du Zn ainsi qu'aux modifications du statut antioxydant à la suite d'un stress radicalaire. L'objectif est également d'identifier le bénéfice thérapeutique potentiel d'une supplémentation en Zn chez les brûlés. Ce bénéfice pourrait être quantifié par la normalisation des paramètres biologiques mesurés en parallèle.

L'objectif terminal est de déterminer les paramètres d'une supplémentation en zinc adaptée à la pathologie spécifique du brûlé. Les bénéfices attendus de la mise en place d'une telle supplémentation concernent directement le patient par la diminution du risque infectieux, des complications secondaires et des séquelles à long terme (fibrose), lui permettant une meilleure réinsertion sociale et économique. Ils peuvent également avoir un impact économique en réduisant la durée d'hospitalisation des victimes.

# **Travail expérimental**



# 1. Influence du statut en zinc dans la réponse à la brûlure : étude expérimentale sur modèle de rats brûlés sub- déficients en zinc.

Cette partie de notre travail a donné lieu à deux publications éditées dans *Biological Trace Element Research* sous les titres :

« Burn-induced oxidative stress is altered by a low zinc status: kinetic study in burned rats fed a low zinc diet. » (*Claeyssen, 2008*)

« Effect of sub-deficient zinc status on insulin sensitivity after burn injury in rats. » (*Claeyssen, 2009*)

## 1.1. Protocole

Les protocoles de brûlure, de prélèvements tissulaires et de dosages sont décrits en annexe. Deux groupes de rats ont reçu respectivement, pendant huit semaines, un régime adéquat en Zn (80 mg/kg de nourriture ou 80 ppm) et un régime carencé (10ppm) avant que ne soit appliquée une brûlure sur 20% de la surface corporelle. Dans chaque groupe, un lot de cinq rats permet de déterminer les valeurs initiales (T0). Les sacrifices ont lieu trois heures (H3), six heures (H6), un jour (J1), deux jours (J2), trois jours (J3), quatre jours (J4), cinq jours (J5), huit jours (J8) et dix jours (J10) après la brûlure (**figure 26**).

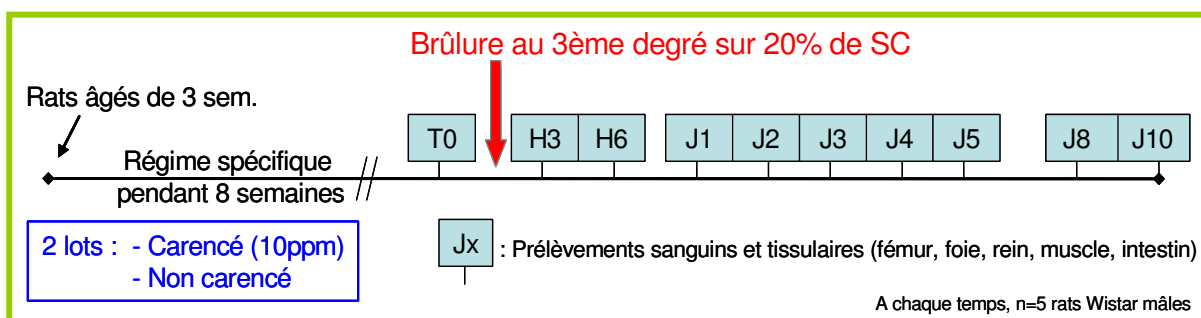


Figure 26 : Procédure expérimentale de l'étude sur les effets d'une carence en zinc après brûlure



## 1.2. Expérimentation I : Etude cinétique du stress oxydant induit par la brûlure

### 1.2.1. Objectifs

De nombreuses études ont souligné le déficit précoce en éléments-trace, chez les patients brûlés ainsi que chez les animaux. Le rôle de ces éléments essentiels dans l'organisme, en particulier au niveau du système de défense antioxydant, est que trop rarement étudié, notamment lors des agressions thermiques étendues. Après les expérimentations menées sur le sélénium au sein de notre équipe, les Centres de Traitement des Brûlés (CTB) sont également demandeurs de travaux permettant de préciser le rôle d'une déficience en zinc chez les grands brûlés, afin d'améliorer leur prise en charge précoce.

Nous avons donc choisi d'étudier l'impact d'une sub-carence en Zn chez des animaux soumis à une agression thermique afin de se rapprocher de la situation nutritionnelle des patients arrivant dans les CTB. En effet, dans la population générale des pays développés, si les carences profondes sont rares, des carences modérées sont courantes. De plus, les brûlés sont généralement recueillis dans les CTB plusieurs heures après le traumatisme, laissant, ainsi, le déficit s'installer.

Nous avons comparé, chez des animaux brûlés normonutris *versus* sub-carencés, l'évolution cinétique (i) du statut en Zn, (ii) des paramètres plasmatiques du stress oxydatif et (iii) des enzymes antioxydantes, dans les premiers jours suivant la brûlure.

### 1.2.2. Paramètres évalués

Les paramètres suivants ont été dosés :

L'oxydation lipidique par l'évaluation de la production des TBARs plasmatiques, hépatiques, rénales et musculaires.

L'oxydation protéique par l'évaluation des groupements thiols plasmatiques.

Le glutathion total (GSH) et oxydé (GSSG) plasmatiques.

La glutathion peroxydase (GPx) et la superoxyde dismutase (SOD) érythrocytaires, hépatiques et rénales.

Le Zn et le Cu plasmatiques, hépatiques, musculaires et osseux.

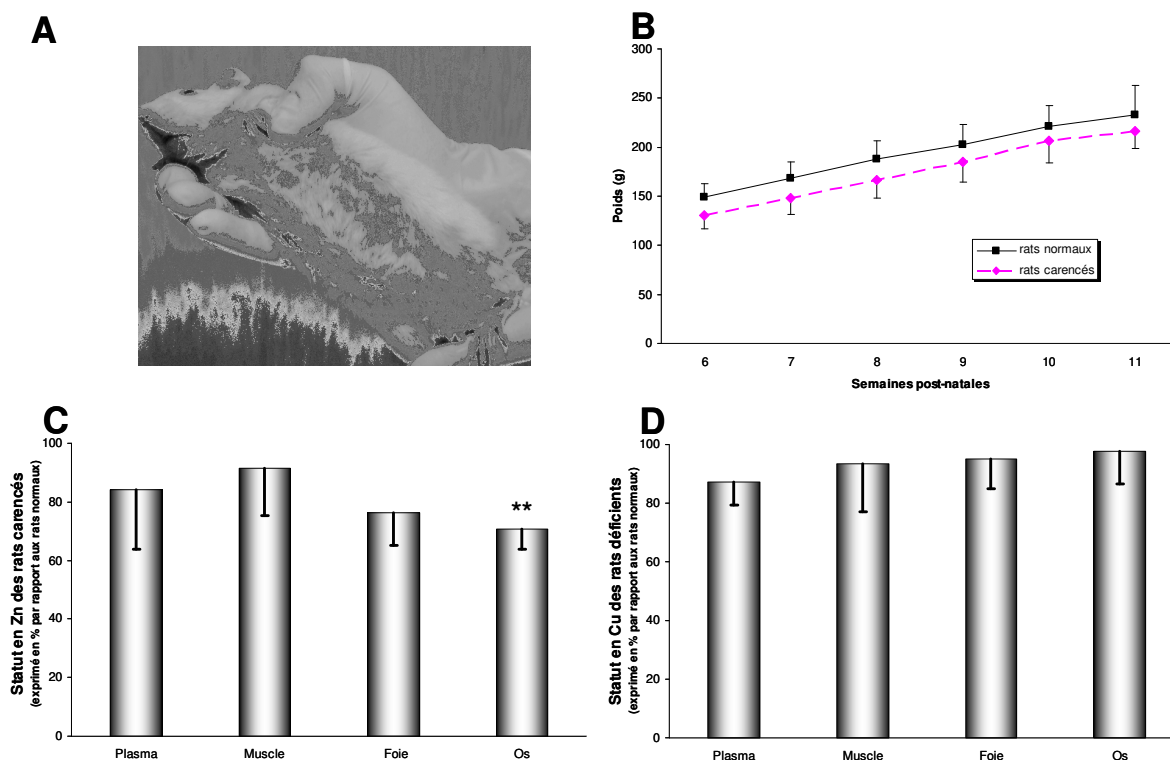
Les taux d'hémoglobine et de cholestérol.

Les concentrations protéiques dans les homogénats tissulaires.

## 1.2.3. Principaux résultats

### 1.2.3.1. Carence modérée : effets avant brûlure

La subdéficience en Zn n'a pas induit, chez les animaux, de problèmes majeurs : la perte de poids reste mesurée, la dépilation est très légère, l'inflammation et la perturbation du métabolisme du cuivre due à l'interaction Cu/Zn, contrôlées par l'évolution du statut cuivrique, sont absentes (figure 27).



**Figure 27 : Modèle expérimental de subdéficience en zinc. A - absence de dépilations majeures ; B - Courbe de croissance des rats normaux et carencés avant la brûlure ; C et D - Teneur en Cu et en Zn de différents organes chez les animaux carencés par rapport aux animaux normaux. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. \*\* $p < 0.01$  par rapport à la valeur « témoin » (100%).**

Seule la quantité de Zn fémoral est significativement plus basse chez les animaux carencés (baisse de 30%), paramètre bien décrit dans le déficit en zinc. Or, les os sont un des réservoirs de Zn échangeable les plus importants. L'organisme a donc assuré l'homéostasie plasmatique et hépatique en Zn en utilisant les réserves osseuses.

Le dérèglement de certains paramètres du stress oxydatif (augmentation des TBARS plasmatiques et hépatiques, diminution du ratio GSH/GSSG), en réponse à la carence, démontre clairement une augmentation de la production des radicaux libres, des dommages

oxydatifs et/ou une baisse des défenses antioxydantes. Le rapport entre le GSH et le GSSG détermine également le taux de transfert du Zn à partir des métallothionéines (MT). Ainsi, une augmentation du GSSG et une baisse du rapport GSH/GSSG mènent à un relargage total du Zn.

### 1.2.3.2. Carence modérée : effets après brûlure

Après brûlure, la baisse du Zn plasmatique est présente dans les deux groupes avec, cependant, une perte accrue chez les animaux carencés, pendant les trois premiers jours. Contrairement au plasma, nous n'avons pas observé, dans le foie, de diminution des teneurs en Zn. Les concentrations hépatiques s'accroissent même significativement chez les animaux normonutris (J10) et carencés (dès J5). Pour ces derniers, les valeurs ne dépassent, cependant, jamais la concentration hépatique initiale des rats non déficients. Une chute importante du Zn osseux est observée à J10 chez les non-carencés, contrairement aux rats carencés dont les valeurs restent basses, mais à un niveau constant.

La chute de la zincémie est en accord avec les autres études. Elle peut être expliquée par la perte de la barrière cutanée, l'augmentation de l'excrétion urinaire et la généralisation de l'inflammation. La stimulation de la production de MTs engendre, également, un transport du Zn accru du sang vers le compartiment hépatique. Les différences initiales, ainsi que l'évolution des réserves en Zn osseux, permettent d'expliquer l'évolution du Zn hépatique dans les deux groupes. En effet, seuls les animaux non carencés ont la possibilité de capter leurs réserves de Zn et de les redistribuer dans le foie. Ce stock de Zn mobilisable a probablement été réduit, chez les rats déficients, lors de la mise en place de la carence (**figure 28**).

Les paramètres du stress oxydatif évoluent de la manière suivante :

- Le ratio GSH/GSSG chute brutalement, chez les animaux non carencés, les cinq premiers jours. Cependant GSH/GSSG est toujours plus bas chez les rats déficients. Par conséquent, connaissant le rôle du GSH dans la protection contre les attaques radicalaires, une déficience en Zn aggraverait le statut antioxydant après une brûlure. De plus, une augmentation du GSSG entraîne un taux de transfert accru du Zn ce qui est en adéquation avec la chute du Zn plasmatique (**figure 29**).

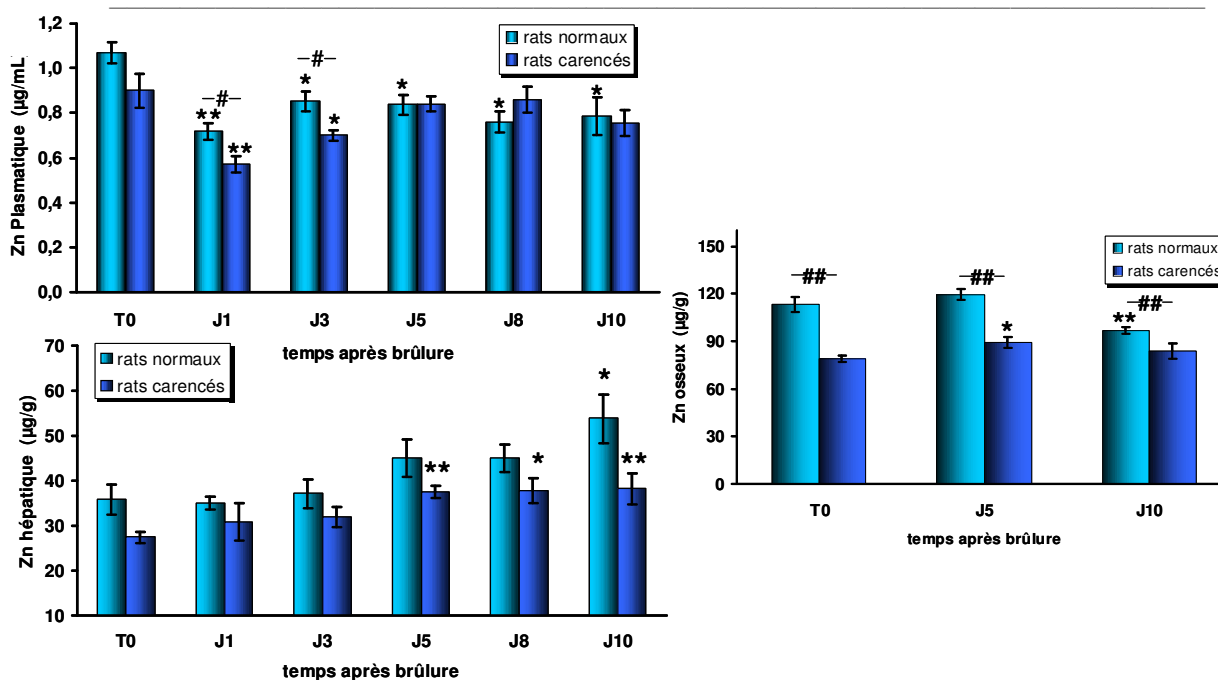


Figure 28 : Evolution des concentrations plasmatique, hépatique et osseuse en Zn chez les rats normaux et carencés, après brûlure.

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM. \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$  : comparaison à T0. #  $p < 0.05$  ; ##  $p < 0.01$  : rats normaux versus rats carencés.

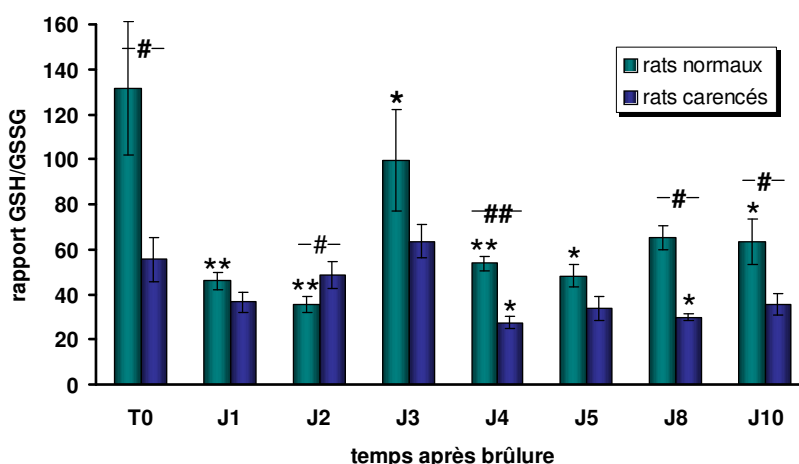


Figure 29 : Evolution du rapport GSH/GSSG chez les rats normaux et carencés, après brûlure.

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM. \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$  : comparaison à T0. #  $p < 0.05$  ; ##  $p < 0.01$  : rats normaux versus rats carencés.

- Les TBARs montrent une évolution inattendue. Nous avons, en effet, mesuré (i) une diminution progressive des taux plasmatiques dans les deux groupes, (ii) des taux hépatiques stables chez les rats déficients et plus élevés que T0 chez les rats normaux, (iii) des taux rénaux inchangés chez les non carencés et légèrement augmentés, jusqu'à J5, chez les carencés, enfin, (iv) des taux musculaires constants. Pourtant, la peroxydation lipidique a largement été documentée chez l'homme ainsi que chez les animaux après agression thermique. Par conséquent, le Zn ne semblerait peut-être pas impliqué, de manière déterminante, dans la protection des lipides contre les radicaux libres induits par la brûlure.

Cependant, ces résultats soulignent également les limites quant à l'utilisation d'un seul paramètre de mesure de la peroxydation lipidique.

- Les thiols plasmatiques sont significativement diminués, chez les animaux carencés, à J1, J8 et J10. Une carence en Zn peut, donc, aisément mener à une diminution de la protection des groupements thiols.

- Les enzymes antioxydantes SOD et GPx sont très faiblement perturbées par la brûlure. Seule la GPx hépatique tend à diminuer, à partir de J5, chez les animaux carencés. Le statut oxydatif dérégulé des rats déficients pourrait mener à un dysfonctionnement de la GPx hépatique, en particulier par une attaque radicalaire des groupements sulfhydryls de cette enzyme. Dans le rein, nous avons précédemment remarqué cette stabilité. En effet, la production de la GPx ayant principalement lieu dans cet organe, le traumatisme induit certainement une augmentation de la synthèse de cette enzyme. En accord avec cette hypothèse, nous avons mis, également, en évidence une mobilisation du sélénium dans le rein, après brûlure, qui est nécessaire à la synthèse de la GPx. Dans la littérature, les résultats concernant la GPx hépatique sont contradictoires. Il semblerait, enfin, que la relative stabilité de la GPx n'entraîne pas de modification de l'activité de la SOD. De plus, le Zn n'ayant qu'un rôle structural dans la SOD à Cu/Zn, une déficience modérée ne peut dérégler son activité.

#### 1.2.4. Conclusions

Une carence en Zn provoque chez des rats un déficit osseux ainsi qu'une augmentation des marqueurs de stress oxydant sans, cependant, affecter les enzymes antioxydantes.

Après brûlure, la carence modifie les flux inter-organes de Zn. Il en résulte une chute plasmatique accrue et une augmentation hépatique plus modérée. Au niveau du statut oxydatif, même si les apports de Zn modulent la réponse de l'organisme face à une agression thermique, un statut carencé ne semble pas être, dans notre modèle expérimental, un élément aggravant majeur à prendre en compte vis-à-vis des dommages induits par une brûlure.

#### 1.2.5. Perspectives

Etant donné les effets bénéfiques d'un statut en Zn optimal reporté chez les patients brûlés ou les modèles animaux, le rôle positif d'un apport en Zn démontré lors des rétablissements cliniques doit être éclairci.

#### 1.2.6. Article « Biological Trace Element Research »

Biol Trace Elem Res (2008) 126 (Suppl 1):S80–S96  
DOI 10.1007/s12011-008-8210-z

## Burn-induced Oxidative Stress is Altered by a Low Zinc Status: Kinetic Study in Burned Rats Fed a Low Zinc Diet

Richard Claeysen · Maud Andriollo-Sanchez ·  
Josiane Arnaud · Laurence Touvard · Antonia Alonso ·  
Yves Chancerelle · Anne-Marie Roussel · Diane Agay

Received: 18 July 2008 / Accepted: 4 August 2008 /  
Published online: 5 September 2008  
© Humana Press Inc. 2008

**Abstract** As an initial subdeficient status of zinc, considered as an essential antioxidant trace element, is frequent in burned patients, we aim to assess the effects of low zinc dietary intakes on burn-induced oxidative stress, in an animal model. After 8 weeks of conditioning diets containing 80 ppm (control group) or 10 ppm of zinc (depleted group), Wistar rats were 20% TBSA burned and sampled 1–10 days after injury. Kinetic evolutions of zinc status, plasma oxidative stress parameters, and antioxidant enzymes were also studied in blood and organs. The zinc-depleted diet induced, before injury, a significant decrease in zinc bone level and the increase of oxidative stress markers without stimulation of antioxidant enzyme activity. After burn, more markedly in zinc depleted animals than in controls, zinc levels decreased in plasma and bone, while increasing in liver. The decrease of thiol groups and GSH/GSSG ratio and the depression of GPx activity in liver are also moderately emphasized. Nevertheless, depleted zinc status could not be considered as determining for oxidative damages after burn injury. Further investigations must also be done to enlighten the mechanism of beneficial effects of zinc supplementation reported in burned patients.

**Keywords** Burn injury · Zinc intakes · Zinc status · Oxidative stress · Rat model

R. Claeysen · M. Andriollo-Sanchez · L. Touvard · A. Alonso · Y. Chancerelle · D. Agay (✉)  
Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, 24 Avenue des Maquis du Grésivaudan, BP87,  
38702 La Tronche cedex, France  
e-mail: diane.agay@crssa.net

R. Claeysen · J. Arnaud · A.-M. Roussel  
INSERM U884, Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, Université Joseph Fourier,  
BP 53, 38041 Grenoble cedex 9, France

J. Arnaud  
Département de Biologie Intégrée, CHU Grenoble, BP 217, 38043 Grenoble Cedex 9, France

 Humana Press

## Introduction

Zinc has a wide range of cellular processes including cell proliferation, immune function, and defense against free radicals as well as genetic stability and function which are crucial to maintain in burn injury [1–3]. Mechanistically, several proteins involved in DNA damage signalling and repair, replicative enzymes (DNA and RNA polymerase), and transcription factors require zinc for proper function [4, 5]. Zinc is also thought to function as an antioxidant through a number of proposed mechanisms: cofactor of Cu-Zn superoxide dismutase, induction of synthesis of metallothioneins, stabilization of membrane lipids against oxidation, and protection of thiol group against iron attacks released after burn injury [6–9].

After major burns, organisms suffer many unresolved metabolic, endocrine, and immune alterations. Some of these changes can be ascribed to disturbance in trace element metabolism [10, 11]. A large involvement of these trace elements (zinc, copper, selenium, and chromium) in the defense against thermal aggression has been demonstrated [12, 13]. Interventional studies in burn patients have demonstrated the beneficial effects of trace element supplementation in reducing the infectious complications, improving wound healing, and shortening length of hospital stays [14]. Thus, zinc status could be determinant in the response against thermal injury. However, whereas low zinc intakes and subdeficient status are frequently observed in general population [15–17], few studies focused on the impact of a low zinc status in the response against burn injury, especially in counteracting the burn-induced oxidative stress.

Therefore, we aimed to evaluate, using an animal model of thermal injury moderately depleted in zinc, the effects of a zinc subdeficient status on burn-induced oxidative stress within the first days following the burn injury. A 20% total body surface area (TBSA) burn injury was applied on both rats receiving Zn adequate and Zn-depleted diets. We followed the change of Zn status in plasma and tissues and different parameters in relation with burn-induced oxidative stress, including thiobarbituric acid reactive species (TBARs) as markers of lipid peroxidation, sulfhydryl groups (SH) for protein oxidation, reduced and oxidized glutathione (GSH/GSSG) as endogenous antioxidant defenses and glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) as antioxidant enzymes.

## Materials and Methods

### Animal Care

The study was conformed to the guidelines established by the National Institute of Health and the procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the French Defence Medical Research Centre. All experiments were performed in accordance with the legislative standards prescribed by the French Ministries of Agriculture and Environment.

Three weeks old male Wistar rats were purchased from Charles River Laboratories (Saint Germain sur l'Arbresle, France). Animals were housed, first by four and then individually relating to their body weight, in thermoformed polystyrene cages and handled daily to minimize experimental stressors. The cages were located in a room with a 12 h–12 h light–dark schedule and a pressurized filter air barrier. The temperature was controlled to  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  for the duration of the experiment with a relative humidity of 55%. Animals received sterilized food and water ad libitum. The litter was also sterilized to limit bacterial contamination risk for the immunodepressed burned animals. Water was demineralized to avoid zinc contamination.

### Design of the Study

Rats were conditioned with two different diets purchased from SAFE (Epinay sur Orge, France) with an adequate (80 ppm) or a depleted (10 ppm) level of zinc (Table 1). Just after delivery, the 80 weaned rats were divided randomly into two series of 40 animals, the control group (C) receiving the 80 ppm Zn diet and the zinc-depleted group (ZD) receiving the 10 ppm Zn diet. Each animal was weighed every week in order to follow their growth curve. The animals received their specific diets for 8 weeks.

After conditioning, each series ( $n=40$ ) were randomly divided into eight groups ( $n=5$ ) before being submitted to burn injury. For each group of diet (10 and 80 ppm Zn) non-burned rats ( $n=5$ ) were used as initial values (T0) and the others animals were sacrificed 1 day (D1), 2 days (D2), 3 days (D3), 4 days (D4), 5 days (D5), 8 days (D8) and 10 days (D10) after thermal injury.

### Experimental Thermal Injury

A non-lethal third-degree thermal injury involving 20% TBSA was applied to the animals according to the method described by Walker and Mason [18]. Briefly, each rat was anesthetized with halothane and its back was shaved before delimitation of the burn area. The anesthetized rat was then fixed flat on its back on a perforated Plexiglas plate and the delimited skin surface was immersed through the hole in a boiling water bath at 100°C for 10 s. To stop the burn process, the rat was then immediately plunged into fresh water and dried with towel before awakening. As this burn procedure leads to a full thickness third degree dermal wound, nervous terminations are histologically and functionally destroyed. The burn lesions appear painless and are also well-tolerated by the rats. Therefore, no analgesic was further required for the burned animals.

### Plasma and Tissue Preparation

#### *Sample Collection*

Animals were fasted overnight before sampling days. Under halothane anesthesia, blood sample collection was performed after laparotomy by vena cava puncture using S-Monovette™ syringes (Sarstedt, Germany) with anticoagulant. Lithium heparinate trace-element-free syringes were used for blood parameters determination. Immediately after blood collection, the rats were killed by section of heart vessels and liver, muscle, kidney, and femur were removed, weighed, placed in mineral-free tubes and frozen in liquid nitrogen.

**Table 1** Ingredients for the Two Diets

Ingredients	
Dextrose	59%
Egg white	20%
Cellulose	6%
Corn oil	5%
Colza oil	2%
Zinc gluconate	80 mg kg <sup>-1</sup> for Zn adequate diet
Vitamin and mineral premix	10 mg kg <sup>-1</sup> for Zn-depleted diet

The mineral premix was prepared without any zinc



### *Plasma and Whole Blood Samples*

For glutathione measurement, 200  $\mu\text{L}$  of whole blood was mixed with 1.8 mL of metaphosphoric acid (MPA 6%) and after centrifugation (10 min; 3,000 g; 4°C), the supernatant was removed and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis.

For glutathione peroxidase (GPx) determination, 25  $\mu\text{L}$  of whole blood was mixed with 1 mL of RANSEL kit diluting agent (Randox Laboratories, Crumlin, UK) and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis.

For other plasmatic parameters, after blood centrifugation (10 min; 3,000 rpm; 4°C), the plasma was removed, dispatched in trace-element-free microtubes and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis.

### *Tissue Samples*

For trace element status determination, tissue samples were stored without any preparation in mineral-free tubes at  $-80^\circ\text{C}$ . For oxidative status determination, liver, kidney, and femoral quadriceps samples were extracted in lysis buffer (Tris-NaOH, 10 mM; diethylenetriamine-pentaacetic acid, 1 mM; phenylmethanesulfonyl fluoride, 1 mM; pH 7.4) with ratio "100 mg of tissue/1 mL of buffer" and centrifuged for 10 min at 3,000 $\times g$  at 4°C. First, 300  $\mu\text{L}$  of supernatant were collected for thiobarbituric acid-reactive species measurement and 100  $\mu\text{L}$  of supernatant was added to 100  $\mu\text{L}$  of NaOH 1N for total proteins determination. After a second centrifugation (20 min; 12,000  $\times g$ ; 4°C), 800  $\mu\text{L}$  of supernatant was collected for GPx activity determination. Samples were then stored until analysis at  $-80^\circ\text{C}$ .

### *Biological Parameters*

#### *Thiobarbituric Acid-Reactive Species*

Lipid peroxidation was measured by TBARs production following a fluorimetric method described by Richard et al. [19]. The calibration curve was obtained from a stock solution of 20  $\text{mmol L}^{-1}$  1,1,3,3-tetraethoxypropane in the range of 1 to 8  $\text{mmol L}^{-1}$ . Standards and samples were placed for 1 h in a boiling water bath at  $95^\circ\text{C}$  in presence of a thiobarbituric acid (TBA)/perchloric acid ( $\text{HClO}_4$ ) mix (2/1 volume respectively) and then the reaction was stopped by cooling in ice. After extraction of the colored malondialdehyde-TBA complex with butanol, the fluorescence was measured on a fluorescence spectrophotometer (Hitachi F4500, B. Braun ScienceTec, France) set at an excitation wavelength of 532 nm and an emission wavelength of 553 nm.

#### *Plasma Thiol Groups*

Protein oxidation was determined as described by Faure et al. by plasma thiol (SH) groups determination [20]. The calibration was obtained from a stock solution of 1,000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  *N*-acetyl cystein (NAC) in the range of 125 to 600  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Standards and plasma samples were measured by spectrophotometry at 415 nm (Hitachi 912, Roche Diagnostics, France) in the presence of 0.05  $\text{mol L}^{-1}$  phosphate buffer, 1  $\text{mmol L}^{-1}$  EDTA, pH 8 and 2.5  $\text{mmol L}^{-1}$  bis-5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB).

#### *Plasma Cholesterol*

Plasma cholesterol was measured by spectrophotometry (Hitachi 912, Roche Diagnostics, France).

### *Total and Soluble Proteins*

Protein concentrations of tissue homogenates were determined by the Pierce method using bicinchoninic acid according to Smith et al. [21] with BCA™ protein assay kit (Interchim, Montluçon, France) on an automatic analyzer (Hitachi 912, Roche Diagnostics, France).

### *Total and Oxidized Glutathione*

Total and oxidized glutathione (GSH and GSSG) were determined as described by Akerboom and Sies [22]. The reduction of DTNB into 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB) was measured by spectrophotometry (Uvikon XS, Secomam, France) following absorption at 412 nm. Values were determined comparing the reduction rate against a standard curve of glutathione. Total glutathione levels (GSH) was measured in prepared whole blood samples (above-mentioned preparation) in the presence of 0.4 mmol L<sup>-1</sup> morpholinopropanesulfonic acid/2 mmol L<sup>-1</sup> EDTA buffer, 4.8 mmol L<sup>-1</sup> nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH), 5 U mL<sup>-1</sup> glutathione reductase, 3.8 mol L<sup>-1</sup> DTNB. Oxidized glutathione were measured in the same conditions with a 1 h previously incubation of standards and samples with triethanolamin and 2-vinyl pyridine monomer.

### *Glutathione Peroxidase*

GPx (EC 1.11.1.9) activity determination was evaluated according to Paglia and Valentine [23] with a RANSEL kit (Randox Laboratories, Crumlin, UK). Briefly, GPx catalyses the oxidation of GSH by cumene hydroperoxide. In the presence of glutathione reductase and NADPH the oxidized glutathione (GSSG) is immediately converted to the reduced form with a concomitant oxidation of NADPH to NADP<sup>+</sup>. The decrease in absorbance at 340 nm is measured.

### *Superoxide Dismutase*

In plasma and tissues samples, superoxide dismutase (SOD) activity was performed using an adaptation of Woolliams et al. and Arthur and Boyne [24, 25]. This method employs xanthine and xanthine oxidase to generate superoxide radicals which react with 2-(4iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (INT) to form a red formazan dye. The superoxide dismutase activity is then measured by the degree of inhibition of this reaction. One unit of SOD is that which causes a 50% inhibition of the rate of reduction of INT under conditions of the assay.

### *Hemoglobin*

Hemoglobin was measured according to the International Committee for the Standardisation in Hematology (ICSH) [26] with Randox hemoglobin kit. Sample analyses were performed after quality controls with ABX Minotrol 8-L (low), ABX Minotrol 8-N (normal) and ABX Minotrol 8-H (high) standards (Horiba ABX, Montpellier, France).

### *Zinc and Copper*

According to the kinetic of mineral exchanges in organs, the zinc assessment was done every sample days in plasma and liver, every 2 days in muscle and every 5 days in femur.

Hepatic, muscular, femoral, and plasmatic zinc concentrations were measured by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) with a Perkin–Elmer 560 model (Norwalk, CT, USA) with previously described methods [27]. Plasma was fivefold diluted in hydrochloric acid 0.1 M, whereas organs were wet ashed with nitric acid 14 M. The ready to use 1 g L<sup>-1</sup> Zinc stock standard solution (Merck, Darmstadt, Germany) was used to prepare calibrants in the range of 1 to 6 μmol L<sup>-1</sup>.

Plasma copper concentration was measured by FAAS with previously described methods [28]. Plasma was fivefold diluted in 6% *n*-butanol. A copper stock solution (Merck, Darmstadt, Germany) was used to prepare calibrants in the range of 1 to 6 μmol L<sup>-1</sup>. Hepatic, muscular, and femoral copper concentrations were measured by electrothermal atomic absorption spectrometry after previous wet ashing with nitric acid 14 M. A copper stock solution was used to prepare calibrants in the range of 0.4 to 1.6 μmol L<sup>-1</sup> in nitric acid 0.1 M.

Seronorm® trace element serum (Sero®, Billingstad, Norway) and NIST-SRM 1577b bovine liver powder (National Institute of Standards & Technology, Gaithersburg, MD, USA) were used as internal quality control respectively for plasma and organs. In the organs, data were expressed as micrograms of Zn or Cu per gram of organ wet weight.

#### Statistical Analysis

All results are expressed as means±SEM. The global course of each parameter was evaluated by Kruskal and Wallis rank test and then the comparisons between controls and burned groups or between normal diet and depleted diet groups were performed with non-parametric rank sum tests (Mann and Whitney tests) using Statistica 7.1 software (StatSoft, France). Differences were considered statistically significant when *p* values were less than 0.05.

## Results

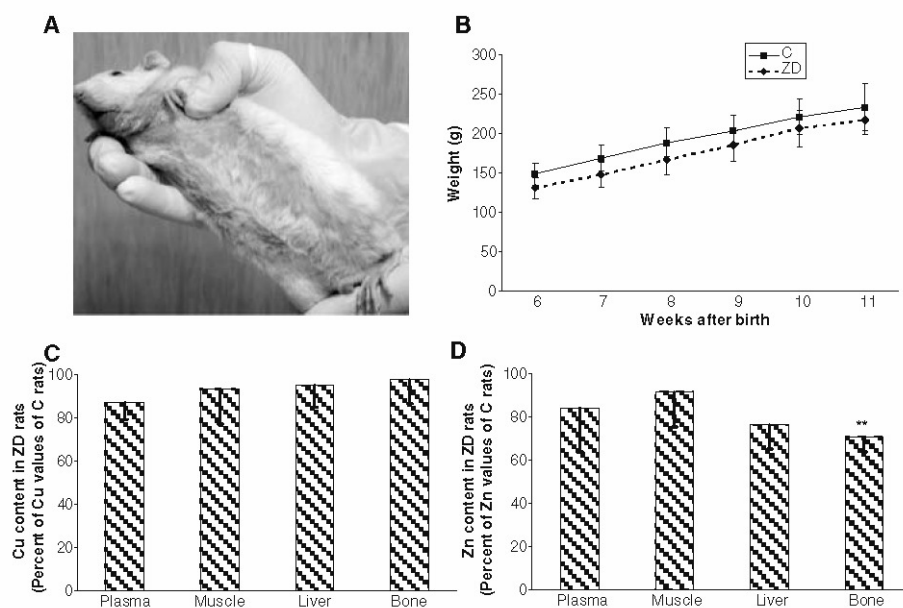
### Clinical Observations

As shown in Fig. 1B, growth curves were not significantly different between the two groups of animals, even if the weight of the animals appeared slightly lower in zinc-depleted group (ZD) than in control group (C). After 6 weeks of depleted zinc diet, ZD rats revealed a moderate depilation in regional skin areas without any other cutaneous symptom, contrary to clinical observations made after severe zinc deficiency (Fig. 1A).

### Biological Parameters before Burn Injury

#### Trace Elements Status

The 8 weeks diet led to a significant lower zinc level ( $p < 0.01$ ) in femoral bone ( $79 \pm 1.5 \mu\text{g g}^{-1}$ ) compared to control group ( $113.3 \pm 4.6 \mu\text{g g}^{-1}$ ), whereas differences between the two groups concerning plasma, liver, and muscle zinc concentrations was effective but not statistically significant. For copper concentrations, no difference was observed after 8 weeks between the two groups in plasma, liver, muscle, and femoral bone (Table 2).



**Fig. 1** Experimental model of zinc subdeficiency. **A** Absence of major clinical side effects. **B** Growth curve of control (C) and zinc-depleted (ZD) rats before injury. Data are presented as means $\pm$ SD ( $n=40$ ). **C** and **D** Copper and zinc assessed in plasma and organs of zinc-depleted animals (ZD). Trace element levels are presented as mean ratio $\pm$ SD ( $n=5$ ) of ZD values to control rats values. \*\* $p<0.01$  compared to the control values (100%)

### Oxidative Stress Parameters

For TBARS, the zinc restriction induced in ZD rats a significant increase both in the plasma and the liver (Table 2). Surprisingly, kidney TBARS were lower in ZD rats than in control animals. Muscle TBARS levels did not change whatever the diet was. GSH/GSSG was significantly lower in ZD rats ( $55.5\pm 9.9$ ) compared to control rats ( $131\pm 29.8$ ). Plasma, liver and kidney GPx and SOD levels as well as plasma total thiol groups were not altered by the zinc depletion before burn injury.

### Evolution of Biological Parameters after Burn Injury

#### Zinc Status

After burn injury, plasma zinc level decreased in the two groups as soon as D1 (Fig. 2). Plasma zinc level never returned to initial value in control group (values significantly different from T0 until 10 days after injury). The plasma zinc level decrease was enhanced in ZD rats within the 3 days following the burn injury. Possibly due to the relative low zinc level measured at T0 for the ZD group, the decrease was statically significant only within the first 3 days.

In liver, zinc level was not significantly altered by the burn injury within the first 3 days but increased significantly at D10 for control animals and more precociously from D5 to D10 for ZD rats. Ten days after burn, control rats presented a significant decrease of zinc level in femoral bone ( $99.3\pm 4.9 \mu\text{g g}^{-1}$ ) compared to T0 ( $115.9\pm 12.4 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Compared to controls, bone zinc level was always lowered in ZD rats, all along the experiment ( $p<0.01$ ).

**Table 2** Oxidative and Trace Element Status of Zinc-Depleted Rats (ZD) Compared to Control Rats (C) before Burn Injury

			Initial values (T0)	
			Control (C)	Zinc-depleted (ZD)
Zinc	Plasma	( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	1.07 $\pm$ 0.11	0.89 $\pm$ 0.18
	Liver	( $\mu\text{g g}^{-1}$ wet weight)	35.9 $\pm$ 8.0	27.4 $\pm$ 3.1
	Muscle	( $\mu\text{g g}^{-1}$ wet weight)	7.3 $\pm$ 1.0	6.7 $\pm$ 1.1
	Bone	( $\mu\text{g g}^{-1}$ wet weight)	115.9 $\pm$ 12.5	82.1 $\pm$ 5.6**
Copper	Plasma	( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	1.16 $\pm$ 0.15	1.01 $\pm$ 0.08
	Liver	( $\mu\text{g g}^{-1}$ wet weight)	5.6 $\pm$ 1.6	5.3 $\pm$ 0.5
	Muscle	( $\mu\text{g g}^{-1}$ wet weight)	1.06 $\pm$ 0.34	1.00 $\pm$ 0.16
	Bone	( $\mu\text{g g}^{-1}$ wet weight)	0.77 $\pm$ 0.04	0.75 $\pm$ 0.08
Plasma thiols groups				
Reduced glutathione/oxidized glutathione ratio			5.58 $\pm$ 1.25	5.43 $\pm$ 0.34
Thiobarbituric acid reactive species (TBARs)				
	Plasma	( $\mu\text{mol}$ )	131.6 $\pm$ 66.7	55.5 $\pm$ 24.3*
	Liver	( $\mu\text{mol g}^{-1}$ proteins)	3.86 $\pm$ 0.5	5.54 $\pm$ 1.11*
	Kidney	( $\mu\text{mol g}^{-1}$ proteins)	0.16 $\pm$ 0.03	0.23 $\pm$ 0.05*
	Muscle	( $\mu\text{mol g}^{-1}$ proteins)	0.21 $\pm$ 0.04	0.13 $\pm$ 0.04**
Superoxide dismutase (SOD)				
	Red blood cells	(U g <sup>-1</sup> Hb)	0.30 $\pm$ 0.05	0.37 $\pm$ 0.1
	Liver	(U g <sup>-1</sup> proteins)	2497 $\pm$ 144	2465 $\pm$ 55
	Kidney	(U g <sup>-1</sup> proteins)	18988 $\pm$ 1850	21144 $\pm$ 1703
Glutathione peroxidase (GPx)				
	Red blood cells	(U g <sup>-1</sup> Hb)	13.35 $\pm$ 0.93	12.17 $\pm$ 0.28*
	Liver	(U g <sup>-1</sup> proteins)	564 $\pm$ 61.2	563.2 $\pm$ 89.8
	Kidney	(U g <sup>-1</sup> proteins)	1558.7 $\pm$ 152.7	1544 $\pm$ 117.7
			1169.2 $\pm$ 104.6	1107.3 $\pm$ 134.4

Data are presented as means $\pm$ SD ( $n=5$ )

\* $p<0.05$  or \*\* $p<0.01$  compared to the control group

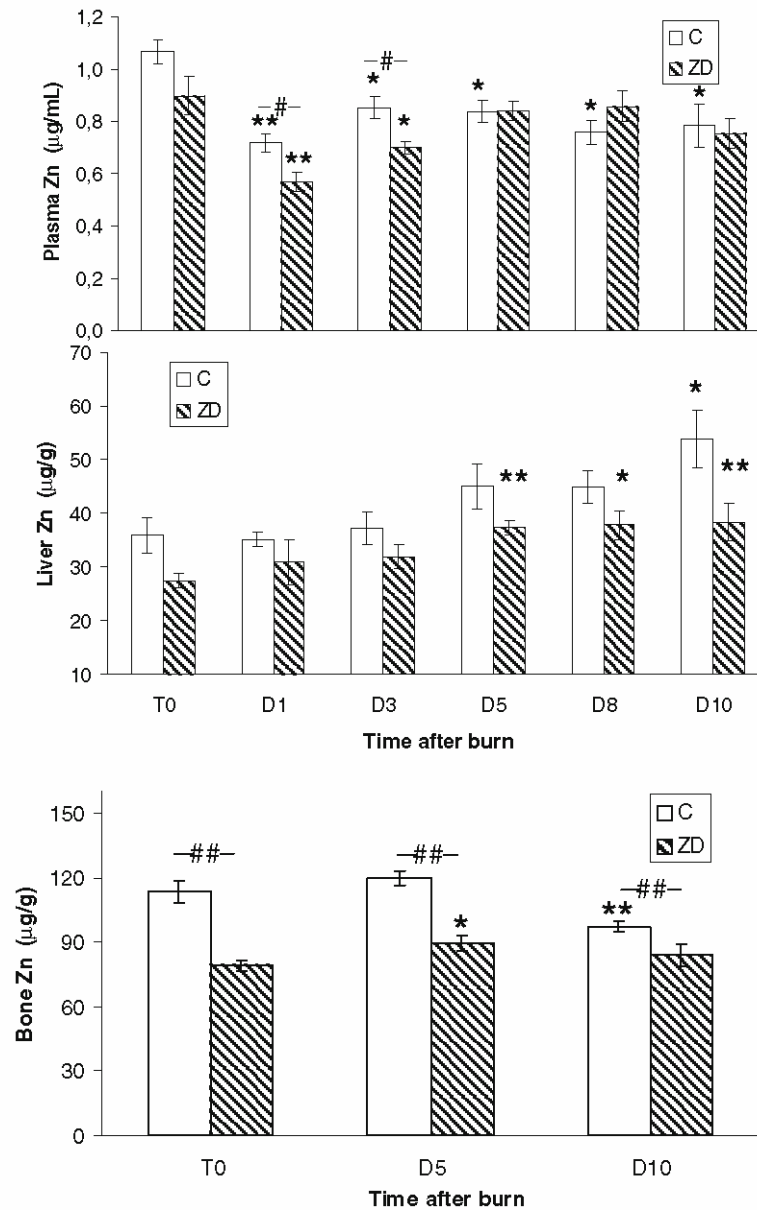
### Oxidative Stress Parameters

Plasma total thiol groups showed a significant decrease only in ZD group at D1, D8, and D10 (Fig. 3).

In the control group, we observed during the first 5 days of the experiment a statistically decrease of GSH/GSSG level compared to T0 (Fig. 4). In ZD group, GSH/GSSG level is also statistically lowered on D4 and D8 compared to T0. In addition, GSH/GSSG decrease was more important for ZD rats than for control rats as soon as D4 and GSH/GSSG tended to increase in controls from D5 to D10.

TBARs plasma level kinetic evolution was similar between normal and depleted series, first in plasma with a progressive decrease of TBARs values, and secondly in muscle with a significant decrease only at D5 (Table 3). In liver, control group values were significantly higher than at T0, while the TBARs pattern was relatively stable in ZD group. In opposite, kidney TBARs pattern is unchanged in controls after burn injury, whereas it tended to increase and return to normal values until the end of the experiment for depleted rats.

Kidney and RBC GPx activity (Fig. 5) as well as RBC, liver and kidney SOD activity (data not shown) were not strongly disrupted by burn in depleted or control animals. In the liver, the GPx activity tended to decrease within 3 days after burn, and zinc deficiency enhanced this decrease from D4 to D10.



**Fig. 2** Evolution of plasma, liver and femoral zinc levels in both control rats (C) and zinc-depleted rats (ZD) after burn injury. Data are presented as means $\pm$ SEM ( $n=5$ ) and are expressed, in organs, on a wet weight basis. \* $p<0.05$  or \*\* $p<0.01$ : comparison to the initial value (T0). # $p<0.05$  or ## $p<0.01$ : comparison between (C) and (ZD) series

## Discussion

Burn injury is associated with enhanced systemic inflammatory reactions [29, 30] and oxygen radicals production [31, 32]. After burn injury, and more generally after trauma,

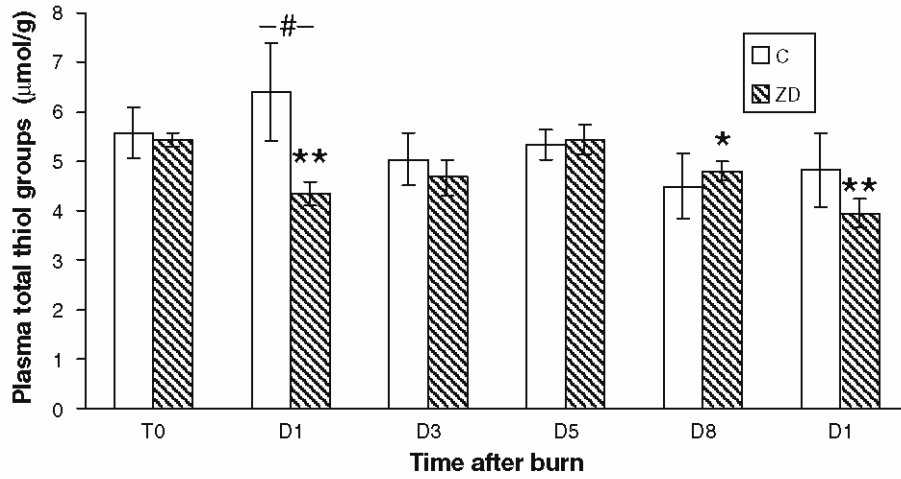


Fig. 3 Evolution of thiol groups in plasma of both control rats (C) and zinc-depleted rats (ZD) after burn injury. Data are presented as means±SEM (n=5). \*p<0.05 or \*\*p<0.01: comparison to the initial value (T0). #p<0.05: comparison between (C) and (ZD) series

imbalance between oxygen species production and free radicals scavengers determine the outcome of local and distant tissue damage and further organ failure [33]. Among antioxidant trace elements, zinc acts in immune system [2], antioxidant mechanisms [34], and tissue repair [35]. A zinc deficient status will have deleterious effect on wound healing and on general recovery of burned patients. In burned patients, zinc intakes could be essential in early protection against oxidative damages [13].

The animal model of thermal injury presents interesting advantages as chosen age, diet and burn severity. It permits also blood and tissue sampling and a kinetic approach of the burn injury pathophysiology. Role of zinc status on metabolism was often examined with

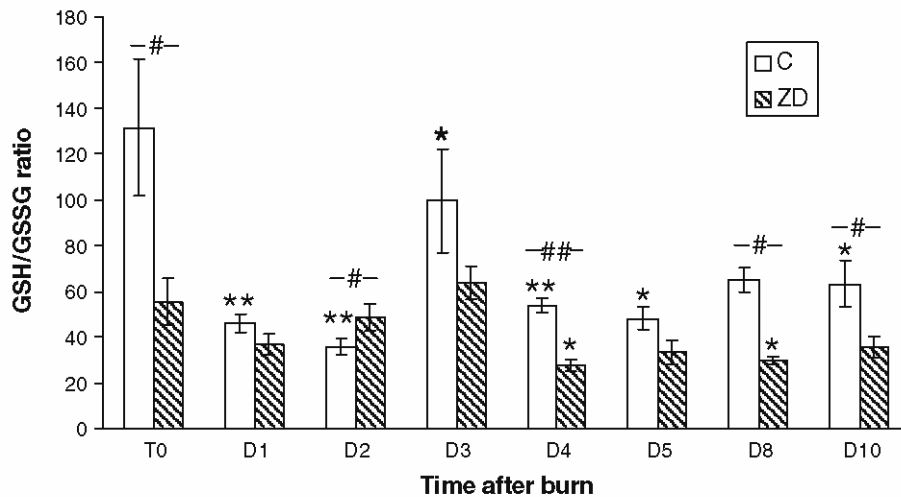


Fig. 4 Evolution of GSH/GSSG ratio in both control (C) and zinc-depleted (ZD) rats after burn injury. Data are presented as means±SEM (n=5). \*p<0.05 or \*\*p<0.01: comparison to the initial value (T0). #p<0.05 or ##p<0.01: comparison between (C) and (ZD) series



**Table 3** Evolution of TBARs Levels in Plasma and Organs of Zn-Depleted (ZD) and Zn Control (C) Rats after Burn Injury

		T0	D1	D3	D5	D8	D10
Plasma	ZD	5.54±1.11	3.83±1.87	3.02±0.19**	3.25±0.72**	4.23±1.14	3.63±0.44**
	C	3.86±0.5#	3.87±0.79	3.38±0.22	2.88±0.47*	2.99±0.17**	3.16±0.26*
Liver	ZD	0.23±0.05	0.27±0.04	0.26±0.04	0.26±0.06	0.24±0.04	0.24±0.04
	C	0.16±0.03#	0.25±0.05*	0.22±0.03*	0.25±0.05*	0.27±0.05**	0.24±0.06*
Kidney	ZD	0.13±0.04	0.20±0.03**	0.22±0.03**	0.26±0.03**	0.22±0.02**	0.22±0.04*
	C	0.21±0.04##	0.21±0.05	0.22±0.03	0.24±0.02	0.23±0.04	0.22±0.03
Muscle	ZD	0.37±0.1	0.46±0.14	0.47±0.03	0.25±0.04*	0.34±0.07	0.32±0.07
	C	0.30±0.05	0.38±0.02*	0.32±0.03	0.19±0.03**	0.30±0.08	0.27±0.06

Data are presented as means ( $n=5$ )±SD and are expressed as the ratio of organ TBARs mean values vs. organs proteins mean values for each group of rats ( $\mu\text{mol L}^{-1} \text{g}^{-1}$  proteins) or as plasma TBARs mean values for each group of rats ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )

\* $p<0.05$  or \*\* $p<0.01$  compared to initial values (T0); # $p<0.05$  or ## $p<0.01$  control series versus Zn depleted series at T0

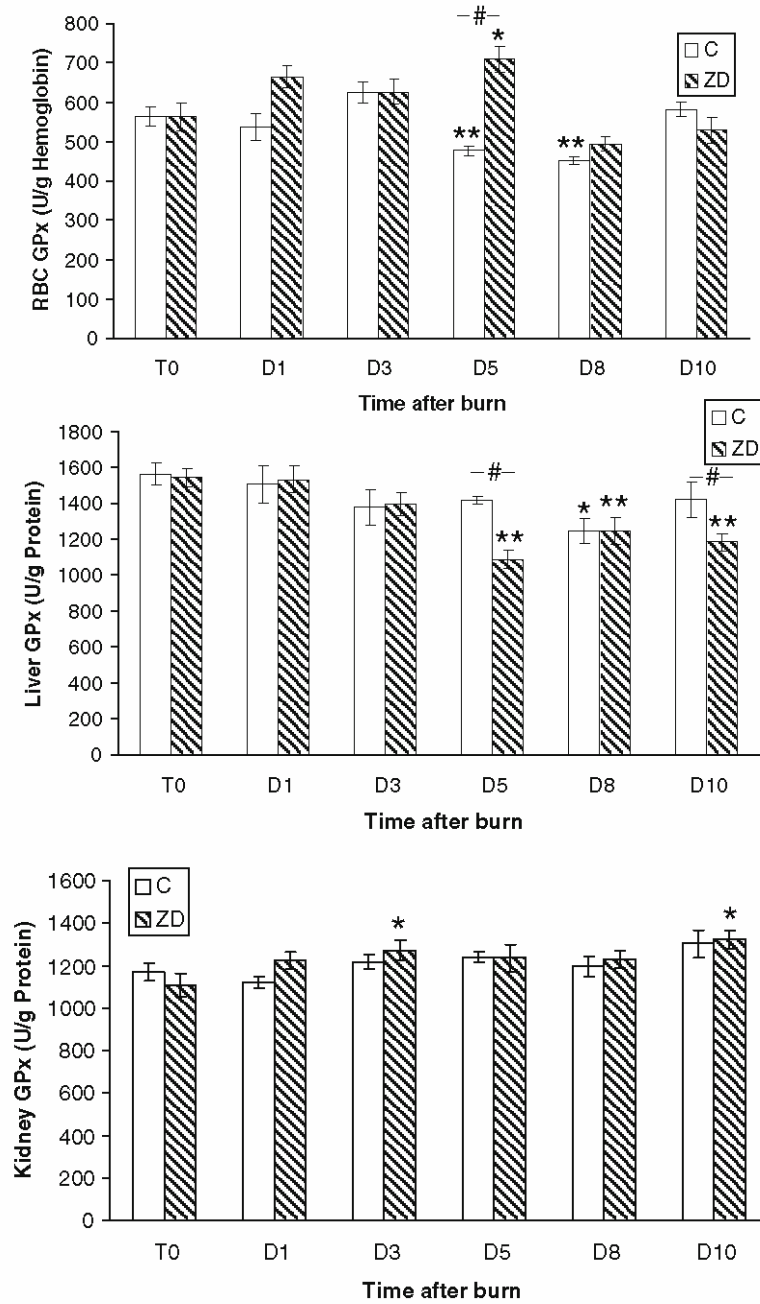
severe Zn deficiency (typically 0–2 ppm) induced in animals. The literature is full of short-term feeding studies [36–39].

Given that population does not suffer of a severe depletion, we decided, in this study, to induce a mild zinc deficiency (10 ppm) in order to mimic burned patients zinc status at their hospitalization in intensive care unit and to avoid characteristic problems of severe zinc deficiency (weight loss, skin lesions, diarrhea, healing impairments, genes expressions, and immune dysfunctions) [40, 41]. After a diet of 11 weeks, we indeed did not observed, in depleted rats, major problems: weight loss was controlled, depilation was very moderate, and absence of inflammation and copper metabolism perturbation due to Zinc/Copper interaction was checked by stable levels of this trace element. Consequently, we could assume that the modifications observed for oxidative stress parameters and for Zn status before burn injury were due to Zn different levels of the diet and not to inflammation status, growth impairment or differences in caloric intake.

In the present study, Zn subdeficient diet was moderately depleted in zinc, but enough to induce a zinc decrease in bone, one of the most important zinc exchangeable pools in the organism [42]. Previous studies have shown that zinc deficiency has detrimental effects on many bone biomechanical indices [43–45]. We observed that plasmatic and hepatic zinc homeostasis was ensured by the transfer from bone to these tissues conducing to low differences in liver and plasma and demonstrating the importance of a pool available to supply deficiencies in essential tissues or fluids. Low hepatic zinc would impair Cu/Zn superoxide-dismutase function, thus allowing free radicals to damage hepatocyte function and structure, leading to hepatocyte necrosis and fibrosis. The existence of two pools of zinc in bone has been suggested by histochemical detection of free/loosely bound zinc ions in osteoid and osteoblasts, traced in matrix vesicles located in the undecalcified bone and in osteoblast [46]. As this pool is limited, with a diet moderately depleted in Zn, it could be postulated that the organism only compensate to bearable limits.

Several studies demonstrated increased free radical production or increased oxidative damage in response to Zn deficiency in vitro or in vivo [47–49]. The present study also led to an increase of oxidative stress in ZD rats. In plasma and liver higher levels of endogenous TBARs were found, suggesting an increased lipid peroxidation in ZD rats. In parallel, GSH/GSSG ratio was decreased indicating that reduced glutathione pool could be





**Fig. 5** Evolution of RBC, liver and kidney glutathione peroxidase levels after burn injury in control (C) and zinc-depleted (ZD) rats. Data are presented as means $\pm$ SEM ( $n=5$ ). \* $p<0.05$  or \*\* $p<0.01$ : comparison to the initial value (T0). # $p<0.05$ : comparison between (C) and (ZD) series

altered by oxidative damage. Moreover, vulnerability to free radical damage in a number of cell systems has been reported in case of GSH depletion [50]. The glutathione redox couple is an actor of free radicals scavenging but plays also an important role both in the rate of zinc transfer and in the ultimate number of zinc atoms transferred from metallothioneins [51]. Under physiological GSH concentrations, Zn transfer from metallothioneins is totally inhibited and GSSG induces a threefold increase of the rate of zinc transfer, leading to a total release of the Zn atoms [52]. Hence, GSSG concentration is a major determinant for efficient Zn transfer. Finally, GSH/GSSG ratio modulates Zn transfer through the redox state. In summary, this system allows a subtle regulation of intracellular Zn movements able to balance nutritional intakes and physiological needs.

#### Impact of Low Zinc Status on Burn-induced Oxidative Stress

The observed decrease in plasma Zn in control group after burn injury was already reported by others [10, 11]. Multiple possible mechanisms could be involved in the Zn status response after thermal injury. A loss of Zn from the skin, where 20% of the body's zinc is stored, has been demonstrated [53]. Zn modification can also be related to the generalization of the burned-induced inflammatory response [54, 55]. The immune cells (macrophages, polymorphonuclear cells and lymphocytes) secrete inflammatory mediators including cytokines and molecules such as nitric oxide and platelet-activating factor, which extend the inflammatory response to the whole system. A large increase of serum IL-6 was observed in burn patients without infections [56]. It was also observed an increase of IL1 during the acute phase response in correlation with a marked depression in the serum Zn [57]. IL-1 and IL-6 stimulate the hepatic acute-phase response proteins implicated in homeostasis preservation [58, 59] and stimulate the production of metallothioneins by JAK/STAT transduction pathway [60]. Metallothioneins are induced and implicated in transport of Zn from blood to the hepatic compartments [61] and, consequently, an enhancement of hepatic Zn participates to the defense against oxidative damage. Our results are in agreement with these data: 1 day after burn injury, serum Zn reached a nadir and never returned to control values whereas liver Zn level progressively increased.

The interesting point is to compare the evolution of liver Zn level in the two groups. In control group, Zn level shows a constant increase from day 3 to 10. In contrast, in ZD rats we observed a progressive restoration of liver Zn level within the first 5 days which remained unchanged compared to the initial value of control group. In the same time, the plasma Zn level was not statistically different between the two groups. Our results (data not shown) indicate that other organs are not involved in zinc mobilization. Consequently, it can be postulated that the only cause for liver Zn could be the bone pool. Indeed, the animals of the control group could have used their free bone pool in aid of critical tissues. In contrast, ZD rats could not have the possibility to increase their liver Zn level over the baseline because this pool is probably at the lowest limit for these animals.

In the present study, decrease of GSH/GSSG ratio, after thermal injury, in both normal and depleted rats could induce an enhancement of Zn transfer towards liver. We can notice that depleted rats have, in most cases, a lower ratio and so a possible more important Zn transfer rate. This fact is suitable with the larger decreases observed in Zn plasma and bone levels in depleted rats.

Physiological properties of glutathione could explain the change of GSH/GSSG ratio. As an intrinsic antioxidant, GSH protect against oxidative stress by spontaneous reactions with free radicals. It also serves as a substrate of GPx and plays an important role in the maintenance of protein sulfhydryl groups [62]. In our study, the decrease of GSH, higher in depleted rats, might suggest that a Zn deficiency worsen antioxidant status after a burn.

After burn injury, within the first week, neither GPx nor SOD activity were modified by zinc deficiency. In liver, the observed decline in GPx activity might be due to modification of the sulfhydryl groups in this enzyme by oxygen free radicals or by TBARs [63]. The impaired oxidative status of depleted rats would lead to a liver GPx malfunctioning. In the kidney, we previously observed the relative stability of GPX [11]. GPx synthesis taking place in the kidney, the trauma certainly induced an increased GPx production in order to counteract free radicals. Moreover, after a burn, a Se mobilization was noted in the kidney [64], Se being used to maintain GPx synthesis. In the liver, controversial results were found about GPX activity after burn injury. In this study, Zn deficiency leads to a lower liver GPx activity (D5 and D10). In agreement with us, Sabeh et al. noted a GPx decrease in the liver in a rabbit model of burn when, in a mice model, Kaway et al. observed that GPx activity increase in the liver only from 4 to 24 h after burn injury [65, 66]. In previous studies, we demonstrated an increase of SOD in reaction to the decrease of GPx in selenium deficient rats [67]. Here, probably related to the stability of GPx, no modification in SOD activity was observed. Moreover, because in Cu/Zn SOD the zinc atoms have only a structural function, moderate zinc deficiency could not impair Cu/Zn SOD activity.

Plasma TBARs are increased in ZD rats compared to control group before burn. This data confirms the deleterious effect of zinc deficiency in increasing lipid peroxidation, as already reported in animals [68–70]. The evolution of plasma TBARs after burn showed an unexpected decrease in the two groups. However, Lipid peroxidation after burn injury has been largely documented in humans [31, 71, 72] and animals [73, 74]. In the present study and contrastly to selenium [67], zinc status does not seem to be determinant to protect lipids from burn-induced free radical production.

After burn injury, the SH groups decrease in ZD animals suggesting an enhanced protein oxidation. The protection of plasma protein sulfhydryl groups is thought to involve reduction of sulfhydryl reactivity through one of three mechanisms: (1) direct binding of Zn to the sulfhydryl, (2) steric hindrance as a result of binding to some other protein site in close proximity to the sulfhydryl group, and (3) a conformational change from binding to some other site on the protein. Hence, a Zn deficiency can easily lead to an impaired protection of thiol groups.

In conclusion, our results, observed in burned rats with moderate depleted zinc diet, show that even if zinc intakes modulate the response to burn injury regarding glutathione and SH groups, a depleted status is not a major component to be considered as aggravating factor toward the burn-induced damages. Further research is needed to support these preliminary data. However, given the beneficial effects of an optimal zinc status reported in burned patients or animal models, the positive role of zinc supplementation demonstrated in clinical recovery should be enlightened.

**Acknowledgements** We thank H. Chaussard, D. Coulon, A. Zocaro and J. Denis (CRSSA, Grenoble) for their excellent technical assistance.

This work was supported by a grant from Délégation Générale à l'Armement (DGA, France).

**Conflict of interest statement** The authors have no financial or proprietary interest in the subject matter.

## References

1. Powell SR (2000) The antioxidant properties of zinc. *J Nutr* 130(5S Suppl):1447S–1454S
2. Hirano T, Murakami M, Fukada T, Nishida K, Yamasaki S, Suzuki T (2008) Roles of zinc and zinc signaling in immunity: zinc as an intracellular signaling molecule. *Adv Immunol* 97c:149–76
3. Dreosti IE (2001) Zinc and the gene. *Mutat Res* 475(1–2):161–167

 Humana Press

inflammatory response in rat brain after peripheral thermal injury. *Neurosci Lett* 407(1):11–15

 Humana Press

4. Witkiewicz-Kucharczyk A, Bal W (2006) Damage of zinc fingers in DNA repair proteins, a novel molecular mechanism in carcinogenesis. *Toxicol Lett* 162(1):29–42
5. Yan M, Song Y, Wong CP, Hardin K, Ho E (2008) Zinc deficiency alters DNA damage response genes in normal human prostate epithelial cells. *J Nutr* 138(4):667–673
6. Marklund SL, Westman NG, Lundgren E, Roos G (1982) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res* 42(5):1955–1961
7. Sato M, Bremner I (1993) Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic Biol Med* 14(3):325–337
8. Della Rovere F, Granata A, Pavia R, Tomaino A, Zirilli A, Monaco F, Familiari D, La Rocca A, Ientile R, Mondello B, Basile G, Monaco M (2004) Vitamins A, E, microelements and membrane lipid peroxidation in patients with neoplastic disease treated with calcium antagonists and antagonists of receptors H2. *Anticancer Res* 24(3a):1449–1453
9. Zago MP, Oteiza PI (2001) The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radic Biol Med* 31(2):266–274
10. Selmanpakoglu AN, Cetin C, Sayal A, Isimer A (1994) Trace element (Al, Se, Zn, Cu) levels in serum, urine and tissues of burn patients. *Burns* 20(2):99–103
11. Agay D, Anderson RA, Sandre C, Bryden NA, Alonso A, Roussel AM, Chancerelle Y (2005) Alterations of antioxidant trace elements (Zn, Se, Cu) and related metallo-enzymes in plasma and tissues following burn injury in rats. *Burns* 31(3):366–371
12. Voruganti VS, Klein GL, Lu HX, Thomas S, Freeland-Graves JH, Herndon DN (2005) Impaired zinc and copper status in children with burn injuries: need to reassess nutritional requirements. *Burns* 31(6):711–716
13. Berger MM, Baines M, Raffoul W, Benathan M, Chiolero RL, Reeves C, Revelly JP, Cayeux MC, Senechaud I, Shenkin A (2007) Trace element supplementation after major burns modulates antioxidant status and clinical course by way of increased tissue trace element concentrations. *Am J Clin Nutr* 85(5):1293–1300
14. Berger MM, Shenkin A (1998) Trace elements in trauma and burns. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1(6):513–517
15. Prasad AS (1996) Zinc deficiency in women, infants and children. *J Am Coll Nutr* 15(2):113–120
16. King JC, Shames DM, Woodhouse LR (2000) Zinc homeostasis in humans. *J Nutr* 130(S5 Suppl):1360S–1366S
17. Pennington JA (1996) Intakes of minerals from diets and foods: is there a need for concern. *J Nutr* 126(9 Suppl):2304S–2308S
18. Walker HL, Mason AD (1968) A standard animal burn. *J Trauma* 8(6):1049–1051
19. Richard MJ, Portal B, Meo J, Coudray C, Hadjian A, Favier A (1992) Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. *Clin Chem* 38(5):704–709
20. Faure P, Lafond JL (1995) Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: Favier AE, Cadet J, Kalnyanaraman M, Fontecave M, Pierre JL (eds) *Analysis of free radicals in biological systems*. Birkäuser, Basel, pp 237–248
21. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150(1):76–85
22. Akerboom TP, Sies H (1981) Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 77:373–382
23. Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70(1):158–169
24. Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH (1983) Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Res Vet Sci* 34(3):253–256
25. Arthur JR, Boyne R (1985) Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. *Life Sci* 36(16):1569–1575
26. International committee for standardization in haematology (1967) Recommendations for haemoglobinometry in human blood. *Br J Haematol* 13:71–75
27. Arnaud J, Bellanger J, Bienvenu F, Chappuis P, Favier A (1986) Recommended method for assaying serum zinc with flame atomic absorption. *Ann Biol Clin* 44(1):77–87
28. Arnaud J, Bellanger J, Chappuis P, Favier A, Galliot M (1985) Recommendations for the assay of serum copper by flame atomic absorption spectrometry. *Ann Biol Clin* 43:297–318
29. Sabeh F, Hockberger P, Sayeed MM (1998) Signaling mechanisms of elevated neutrophil O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation after burn injury. *Am J Physiol* 274(2 Pt 2):R476–R485
30. Reyes R Jr., Wu Y, Lai Q, Mrizek M, Berger J, Jimenez DF, Barone CM, Ding Y (2006) Early inflammatory response in rat brain after peripheral thermal injury. *Neurosci Lett* 407(1):11–15

31. Pintaudi AM, Tesoriere L, D'Arpa N, D'Amelio L, D'Arpa D, Bongiorno A, Masellis M, Livrea MA (2000) Oxidative stress after moderate to extensive burning in humans. *Free Radic Res* 33(2):139–146
32. Gurbuz V, Corak A, Yegen BC, Kurtel H, Alican I (1997) Oxidative organ damage in a rat model of thermal injury: the effect of cyclosporin A. *Burns* 23(1):37–42
33. Farriol M, Fuentes F, Venereo Y, Solano I, Orta X, Segovia T (2001) Antioxidant capacity in severely burned patients. *Pathol Biol (Paris)* 49(3):227–231
34. Jing MY, Sun JY, Zi NT, Sun W, Qian LC, Weng XY (2007) Effects of zinc on hepatic antioxidant systems and the mRNA expression levels assayed by cDNA microarrays in rats. *Ann Nutr Metab* 51(4):345–351
35. Casey G (2003) Nutritional support in wound healing. *Nurs Stand* 17(23):55–58
36. Eberle J, Schmidmayer S, Erben RG, Stangassinger M, Roth HP (1999) Skeletal effects of zinc deficiency in growing rats. *J Trace Elem Med Biol* 13(1–2):21–26
37. Hosea HJ, Taylor CG, Wood T, Mollard R, Weiler HA (2004) Zinc-deficient rats have more limited bone recovery during repletion than diet-restricted rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 229(4):303–311
38. Bruno RS, Song Y, Leonard SW, Mustacich DJ, Taylor AW, Traber MG, Ho E (2007) Dietary zinc restriction in rats alters antioxidant status and increases plasma F2 isoprostanes. *J Nutr Biochem* 18(8):509–518
39. Oteiza PI, Olin KL, Fraga CG, Keen CL (1995) Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes. *J Nutr* 125(4):823–829
40. Cuevas LE, Koyanagi A (2005) Zinc and infection: a review. *Ann Trop Paediatr* 25(3):149–160
41. Prasad AS (2008) Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Exp Gerontol* 43(5):370–377
42. Giugliano R, Millward DJ (1984) Growth and zinc homeostasis in the severely Zn-deficient rat. *Br J Nutr* 52(3):545–560
43. Salgueiro MJ, Torti H, Meseri E, Weill R, Orlandini J, Urriza R, Zubillaga M, Janjetic M, Barrado A, Boccio J (2006) Dietary zinc effects on zinc, calcium, and magnesium content in bones of growing rats. *Biol Trace Elem Res* 110(1):73–78
44. Peretz A, Papadopoulos T, Willems D, Hotimsky A, Michiels N, Siderova V, Bergmann P, Neve J (2001) Zinc supplementation increases bone alkaline phosphatase in healthy men. *J Trace Elem Med Biol* 15(2–3):175–178
45. Yamaguchi M, Ehara Y (1995) Zinc decrease and bone metabolism in the femoral-metaphyseal tissues of rats with skeletal unloading. *Calcif Tissue Int* 57(3):218–223
46. Danscher G, Mosekilde L, Rungby J (1999) Histochemical detection of zinc in mineralizing rat bone: autoradiographic tracing of zinc ions in the mineralization front, osteocytes and osteoblasts. *J Histotechnol* 22:85–90
47. Oteiza PI, Clegg MS, Zago MP, Keen CL (2000) Zinc deficiency induces oxidative stress and AP-1 activation in 3T3 cells. *Free Radic Biol Med* 28(7):1091–1099
48. Ho E, Ames BN (2002) Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFkappa B, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26):16770–16775
49. Bray TM, Kubow S, Bettger WJ (1986) Effect of dietary zinc on endogenous free radical production in rat lung microsomes. *J Nutr* 116(6):1054–1060
50. Reed DJ (1990) Glutathione: toxicological implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:603–631
51. Jiang LJ, Maret W, Vallee BL (1998) The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7):3483–3488
52. Maret W (1994) Oxidative metal release from metallothionein via zinc-thiol/disulfide interchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(1):237–241
53. Berger MM, Cavadini C, Bart A, Mansourian R, Guinchard S, Bartholdi I, Vandervale A, Krupp S, Chiolerio R, Freeman J et al (1992) Cutaneous copper and zinc losses in burns. *Burns* 18(5):373–380
54. Bloemsma GC, Dokter J, Boxma H, Oen IM (2008) Mortality and causes of death in a burn centre. *Burns* (in press)
55. Faunce DE, Llanas JN, Patel PJ, Gregory MS, Duffner LA, Kovacs EJ (1999) Neutrophil chemokine production in the skin following scald injury. *Burns* 25(5):403–410
56. Yeh FL, Lin WL, Shen HD, Fang RH (1999) Changes in circulating levels of interleukin 6 in burned patients. *Burns* 25(2):131–136
57. Darlington GJ, Wilson DR, Lachman LB (1986) Monocyte-conditioned medium, interleukin-1, and tumor necrosis factor stimulate the acute phase response in human hepatoma cells in vitro. *J Cell Biol* 103(3):787–793
58. Le JM, Vilcek J (1989) Interleukin 6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. *Lab Invest* 61(6):588–602
59. Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Andus T, Geiger T, Trullenque R, Fabra R, Heinrich PC (1989) Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett* 242(2):237–239

60. Lee DK, Carrasco J, Hidalgo J, Andrews GK (1999) Identification of a signal transducer and activator of transcription (STAT) binding site in the mouse metallothionein-I promoter involved in interleukin-6-induced gene expression. *Biochem J* 337(Pt 1):59–65
61. Beattie H, Bremner I (2000) Metallothioneins: their cellular function and relationship with zinc. In: Roussel AM, Anderson RA, Favier AE (eds) Trace elements in man and animals. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp 961–967
62. Meister A, Anderson ME (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52:711–760
63. Pigeolet E, Remacle J (1991) Susceptibility of glutathione peroxidase to proteolysis after oxidative alteration by peroxides and hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med* 11(2):191–195
64. Sandre C, Agay D, Ducros V, Van Uye A, Cruz C, Chancerelle Y, Roussel AM (2004) Early evolution of selenium status and oxidative stress parameters in rat models of thermal injury. *J Trace Elem Med Biol* 17(4):313–318
65. Sabeh F, Baxter CR, Norton SJ (1995) Skin burn injury and oxidative stress in liver and lung tissues of rabbit models. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 33(6):323–328
66. Kawai S, Komura J, Asada Y, Niwa Y (1988) Experimental burn-induced changes in lipid peroxide levels, and activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in skin lesions, serum, and liver of mice. *Arch Dermatol Res* 280(3):171–175
67. Sandre C, Agay D, Ducros V, Faure H, Cruz C, Alonso A, Chancerelle Y, Roussel AM (2006) Kinetic changes of oxidative stress and selenium status in plasma and tissues following burn injury in selenium-deficient and selenium-supplemented rats. *J Trauma* 60(3):627–634
68. Hidalgo MC, Exposito A, Palma JM, de la Higuera M (2002) Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int J Biochem Cell Biol* 34(2):183–193
69. Miceli MV, Tate DJ Jr., Alcock NW, Newsome DA (1999) Zinc deficiency and oxidative stress in the retina of pigmented rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(6):1238–1244
70. Shaheen AA, el-Fattah AA (1995) Effect of dietary zinc on lipid peroxidation, glutathione, protein thiols levels and superoxide dismutase activity in rat tissues. *Int J Biochem Cell Biol* 27(1):89–95
71. Kumar R, Seth RK, Sekhon MS, Bhargava JS (1995) Serum lipid peroxide and other enzyme levels of patients suffering from thermal injury. *Burns* 21(2):96–97
72. Ritter C, Andrades M, Guerreiro M, Zavaschi L, Gelain DP, Souza LF, Ribeiro CA, Clausell N, Menna-Barreto S, Moreira JC, Dal-Pizzol F (2003) Plasma oxidative parameters and mortality in patients with severe burn injury. *Intensive Care Med* 29(8):1380–1383
73. Sener G, Satyroglu H, Ozer Sehirli A, Kacmaz A (2003) Protective effect of aqueous garlic extract against oxidative organ damage in a rat model of thermal injury. *Life Sci* 73(1):81–91
74. Altavilla D, Galeano M, Bitto A, Minutoli L, Squadrito G, Seminara P, Venuti FS, Torre V, Calo M, Colonna M, Lo Cascio P, Giugliano G, Scuderi N, Mioni C, Leone S, Squadrito F (2005) Lipid peroxidation inhibition by raxofelast improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. *Shock* 24(1):85–91





## 1.3. Expérimentation II : Insulino-résistance associée à la brûlure et carence en Zn

### 1.3.1. Objectifs

L'hypermétabolisme et l'hyperglycémie résultant de la brûlure induisent, chez les grands brûlés, une insulino-résistance. Ce dérèglement métabolique a des conséquences délétères sur l'organisme et aggrave la situation déjà très complexe. Par conséquent, les facteurs pouvant influencer le métabolisme glucidique et l'action de l'insuline sont d'un grand intérêt. De nombreuses études ont montré la relation qui existe entre le zinc et les fonctions de l'insuline. Or, chez les patients brûlés, souvent déjà sub-déficitaires en Zn comme une fraction non négligeable de la population générale, s'installe très rapidement un déficit en Zn. Par conséquent, dès les premières heures après brûlure, le statut en Zn pourrait être déterminant dans les processus physiopathologiques menant à l'insulino-résistance. Nous avons donc voulu vérifier si une carence modérée en Zn représentait ou non un risque accru lors d'une agression thermique.

Dans cet objectif, nous avons étudié l'impact d'un statut sub-déficient en Zn dans l'insulino-résistance post-brûlure, sur notre modèle animal d'agression thermique. Dans cette étude, nous avons évalué le statut en Zn ainsi que l'évolution de paramètres biochimiques et hormonaux liés au glucose et à l'insuline.

### 1.3.2. Paramètres évalués

Les paramètres suivants ont été dosés :

- Le Zn plasmatique, hépatique, musculaire et fémoral.
- Le glucose, l'urée, l'albumine et la créatinine.
- L'insuline, la leptine et la corticostérone.

### 1.3.3. Principaux résultats

L'évolution du statut en Zn a déjà été décrite dans la publication précédente.

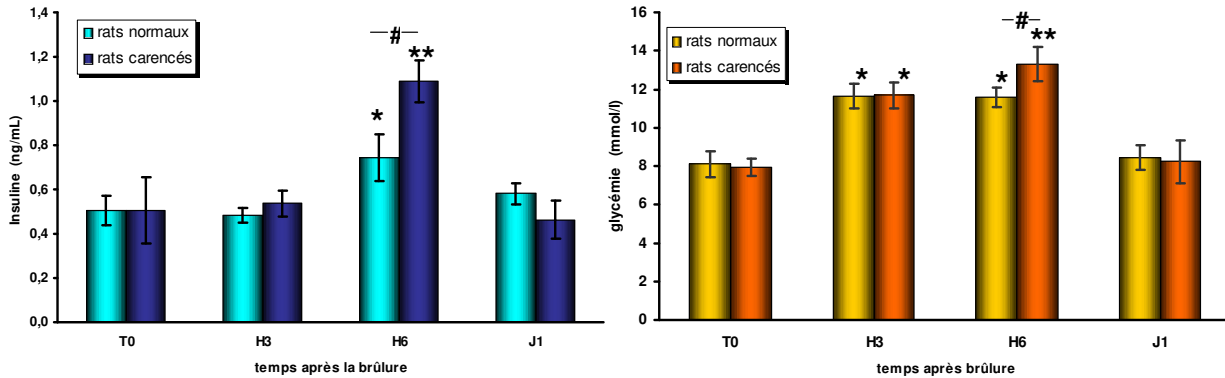
Un pic d'insuline a lieu, dans les deux groupes, à H6. Cependant, la sécrétion de cette hormone est significativement plus importante chez les rats carencés (**figure 30**).

Concernant les paramètres biochimiques plasmatiques, il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes. Le glucose, l'urée et la créatinine ont augmentés à H3 et H6 (**figure 30**). La créatinine reste élevée à J1 chez les rats carencés. En parallèle, l'albumine décroît progressivement jusqu'à J1.



La corticostérone est relarguée massivement à H3, chez tous les animaux. Une nouvelle augmentation de cette hormone a lieu, à J1, chez les animaux carencés contrairement aux non carencés.

La leptine est significativement augmentée chez les rats déficients à H3 et H6 alors qu'elle reste stable chez les non carencés.



**Figure 30 : Evolution de la glycémie et de l'insulinémie après brûlure.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM. \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$  : comparaison à T0. #  $p < 0.05$  : rats normaux versus rats carencés.

La perturbation attendue du système insuline/glucose est effectivement observée. L'augmentation de la glycémie est liée au taux croissant de production de glucose en réponse aux besoins caloriques accrus. Cependant, le glucose plasmatique demeure élevé six heures après la brûlure et ceci en dépit d'une nette augmentation de l'insuline. Ces résultats sont, donc, cohérents avec la mise en place d'une insulino-résistance.

L'insulino-résistance entraîne également des perturbations au niveau du métabolisme protéique avec une dégradation accrue des protéines puisque l'urée et la créatinine augmentent. Ce catabolisme protéique est renforcé par le relargage d'hormones de stress telles que la corticostérone.

Le statut en Zn semble moduler l'insulino-sensibilité consécutive à la brûlure. En effet, les concentrations en glucose et en insuline sont significativement plus élevées chez les animaux carencés qui présentent des réserves osseuses et des niveaux plasmatiques en Zn plus bas. Le Zn influence la sensibilité de l'insuline à plusieurs niveaux : (i) il est nécessaire à la stabilisation de sa structure ; (ii) il intervient dans sa sécrétion au niveau des îlots pancréatiques en régulant des canaux potassium ; (iii) il agit sur la « protein tyrosine phosphatase 1B », une enzyme-clé régulant la phosphorylation du récepteur à l'insuline.

### **1.3.4. Conclusions**

Nos résultats montrent qu'une agression thermique entraîne une augmentation rapide de la glycémie liée à une baisse de la sensibilité à l'insuline. Chez les animaux déficients en Zn, cet effet est accentué. Par conséquent, il existe un intérêt majeur à restaurer et à contrôler le statut en Zn après une brûlure étendue, afin de limiter les effets délétères de l'insulino-résistance.

### **1.3.5. Article « Biological Trace Element Research »**



Biol Trace Elem Res (2009) 127:132–142  
DOI 10.1007/s12011-008-8226-4

## Effect of Sub-deficient Zinc Status on Insulin Sensitivity after Burn Injury in Rats

Richard Claeysen · Maud Andriollo-Sanchez ·  
Josiane Arnaud · Laurence Touvard · Antonia Alonso ·  
Yves Chancerelle · Anne-Marie Roussel · Diane Agay

Received: 19 May 2008 / Accepted: 26 June 2008 /  
Published online: 19 September 2008  
© Humana Press Inc. 2008

**Abstract** Although zinc status is an important parameter in insulin sensitivity, data concerning its implication in noxious burn-induced insulin resistance are scarce. The present study was designed to evaluate the impact of zinc status before burn on the recovery of injury with focus on plasma insulin and glucose levels. The experiment was performed in male adult Wistar rats fed from weaning with a zinc normal diet (80 ppm) or a depleted zinc diet (10 ppm) for 8 weeks and burned to third degree on 20% of their total body surface area. Blood and tissue samples were collected 3, 6, and 24 h after injury in order to study biochemical parameters and the glucose/insulin response in relation with the zinc status. After burn, zinc-depleted rats presented an exacerbated decrease in plasma zinc level. In addition, the burn-induced insulin resistance, leading to protein catabolism, was emphasized, with higher plasma insulin, glucose, and leptin levels in zinc-deficient animals versus normal-fed rats. Our experimental results underlined the interest to early control the zinc status in order to limit the deleterious effects of oxidative stress and insulin resistance in burned patients.

**Keywords** Burn injury · Zinc status · Insulin sensitivity · Hyperglycaemia · Rat model

### Introduction

As other physical agents, burn injury could lead to an insulin resistance, as demonstrated in animal models [1]. In response to severe injury, burned patients present a dramatic hypercatabolism related to tissular decreased insulin sensitivity [2]. Burn-induced

---

R. Claeysen · M. Andriollo-Sanchez · L. Touvard · A. Alonso · Y. Chancerelle · D. Agay (✉)  
Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, 24 Avenue des Maquis du Grésivaudan,  
BP 87, 38702 La Tronche cedex, France  
e-mail: diane.agay@crssa.net

R. Claeysen · J. Arnaud · A.-M. Roussel  
INSERM U884, Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, Université Joseph Fourier,  
BP 53, 38041 Grenoble cedex 9, France

J. Arnaud  
Département de Biologie Intégrée, CHU Grenoble, BP 217, 38043 Grenoble Cedex 9, France

 Humana Press

hyperglycemia may also adversely affect immune functions and consequently increase the nosocomial infection risk [3]. Therefore, the factors influencing the glucose metabolism are to be kept in mind in a therapeutic approach, in order to improve the wound healing of the patients. The use of insulin therapy in burned patients and in experimental models leads to beneficial effects by counteracting the burn-induced alterations of glucose metabolism and limiting inflammatory processes and proteic hypercatabolism [4, 5]. Nevertheless, use of pharmacologic doses of insulin could result in side effects and induce hepatic and respiratory failure [6, 7]. Consequently, identifying factors limiting the burn-induced insulin resistance could be of interest.

We have previously reported that, after severe burn, trace element status may modulate the insulin resistance in rats, particularly chromium [8]. Other trace elements are involved in the glucose and insulin responses. Among them, the zinc is one of the most important. As soon as 1966, Quaterman et al. observed in zinc-deficient animals a reduced insulin secretion and insulin sensitivity [9]. Since this primary report, numerous studies have underlined the strong relationship between zinc and insulin metabolism and functions [10]. In addition, zinc is known to have an insulinomimetic action by increasing peripheral glucose disposal [11, 12] and by stimulating lipogenesis [13]. In burned patients, previous clinical studies have demonstrated the decrease in zinc status [14, 15], as a consequence of both large exudative losses through the burned areas and exacerbated urinary losses [16]. This decline may become critical if the patients exhibit marginal zinc status before burn injury [17–19].

In this context, the initial zinc status of injured patients should be determining for pathophysiological processes observed after burn injury. Although the classically described zinc sub-deficiency appears well tolerated in healthy populations, it could be particularly detrimental for injured persons, like after a major burn with exacerbated zinc losses [16]. It is also necessary to check if a moderated zinc sub-deficiency, such as that observed in general population [20], beside any question of real established zinc deficiency, represents or not a risk factor in case of injury.

In this study, we also aimed at studying the impact of zinc sub-deficient status on burn-induced insulin resistance in an experimental animal model that allowed the assessment of zinc levels in organs in relation with the glucose and insulin responses. We postulated that sub-deficiency in zinc prior to severe burn injury has a negative effect on insulin sensitivity which itself delayed the wound healing and therefore increased the mean stay of burned patients in intensive care units. A better knowledge of these pathophysiological mechanisms would permit to propose new therapeutic pathways.

## Materials and Methods

### Animal Care

The study was conformed to the guidelines established by the National Institute of Health and the procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the French Defence Medical Research Centre. All experiments were performed in accordance with the legislative standards prescribed by the French Ministries of Agriculture and Environment.

Just after weaning, 3-week-old male Wistar rats were purchased from Charles River Laboratories (Saint Germain sur l'Arbresle, France). Animals were housed, first by four and then individually relating to their body weight, in thermoformed polystyrene cages and handled daily to minimize experimental stressors. The cages were located in a room with a 12 h–12 h light–dark schedule and a pressurized filter air barrier. The temperature was

controlled to  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  for the duration of the experiment with a relative humidity of 55%. Animals received sterilized food and water ad libitum. The litter was also sterilized to limit bacterial contamination risk. Water was demineralized to avoid zinc contamination.

#### Design of the Study

Two different diets were purchased from SAFE (Epinay sur Orge, France) with an adequate (80 ppm) or a depleted (10 ppm) level of zinc. This moderated zinc depletion rate was chosen in order to simply exhaust the zinc reserves in the body, without leading to any clinical symptom.

In a first step, 40 rats were conditioned with the two zinc diets. Just after delivery, the 40 weaned rats were divided randomly into two series of 20 animals, the normal group (NG rats) receiving the 80 ppm Zn diet and the depleted group (DG rats) receiving the 10 ppm Zn diet. The animals received their specific diets for 8 weeks to allow the stabilization of their zinc status, until their body weights reached about 200 g.

After conditioning, each series ( $n=20$ ) were randomly divided into four groups ( $n=5$ ) before being submitted to burn injury. For each group of diet (10 and 80 ppm Zn), non-burned rats ( $n=5$ ) were used as control (T0) and the other animals were sacrificed 3 h (H3), 6 h (H6), and 1 day (D1) after thermal injury.

#### Experimental Thermal Injury

A non-lethal third-degree thermal injury involving 20% of the total body surface area (TBSA) was applied to the animals according to the method described by Walker and Mason [21]. Briefly, each rat was anesthetized with halothane and its back was shaved before delimitation of the burn area. The anesthetized rat was then fixed flat on its back on a perforated Plexiglas plate and the delimited skin surface was immersed through the hole in a boiling water bath at  $100^\circ\text{C}$  during 10 s. To stop the burn process, the rat was then immediately plunged into fresh water and dried with towel before awakening. As this burn procedure leads to a full thickness third-degree dermal wound, nervous terminations are histologically and functionally destroyed. The burn lesions appear painless and are also well tolerated by the rats. Therefore, no analgesic was further required for the burned animals.

#### Sample Collection

Under halothane anesthesia, blood sample collection was performed after laparotomy by vena cava puncture using S-Monovette™ syringes (Sarstedt, Germany) with or without anticoagulant. Lithium heparinate trace element-free syringes were used for Zn determination, dry sampling syringes for insulin, leptin, and corticosterone measurements. Immediately after blood collection, the rats were killed by section of heart vessels and liver, muscle, and femur were removed, weighed, placed in mineral-free tubes, and frozen in liquid nitrogen. After blood centrifugation (10 min, 3,000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ ), the plasma or the serum was removed and dispatched in trace element-free microtubes. The serum and plasma samples and organs were stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis.

#### Biological Parameters

Blood glucose, albumin, urea, and creatinine were analyzed, by enzymatic or colorimetric methods, with an automatic analyzer (Hitachi 912, Roche Diagnostics, France) using

 **Humana Press**

commercial kits (Roche, Meylan, France). Total antioxidant status (TAS) kit was purchased from Randox Laboratories (Crumblin, UK).

Hormone analyses were assayed by radioimmunoassay using commercial kits. Plasma insulin and leptin kits were supplied by Linco Research (St. Charles, MI, USA) and the kit for corticosterone by Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, CA, USA).

Hepatic, muscular, femoral, and plasmatic zinc concentrations were measured by flame atomic absorption spectrometry with a Perkin-Elmer 560 model (Norwalk, CT, USA) with previously described methods [22, 23]. Plasma was diluted fivefold in hydrochloric acid 0.1 M, whereas organs were wet ashed with nitric acid 14 M. The ready to use 1 g L<sup>-1</sup> zinc stock standard solution (Merck, Darmstadt, Germany) was used to prepare calibrants in the range of 1 to 6 μmol L<sup>-1</sup>. Seronorm® trace element serum (Sero®, Billingstad, Norway) and NIST-SRM 1577b bovine liver powder (National Institute of Standards & Technology, Gaithersburg, MD, USA) were used as internal quality control respectively for plasma and organs.

### Statistical Analysis

All results are expressed as means±SEM. The global course of each parameter was evaluated by Kruskal and Wallis rank test and then the comparisons between controls and burned groups or between normal diet and depleted diet groups were performed with non-parametric rank sum tests (Mann and Whitney tests) using Statistica 7.1 software (StatSoft, France). Differences were considered statistically significant when *p* values were less than 0.05.

## Results

No clinical differences were observed between DG and NG rats during the first day after the burn injury. As the appetency of the two diets was controlled, the food intake and the growth curves of the rats were similar in the two series (data not shown).

### Plasma and Organ Zinc Levels

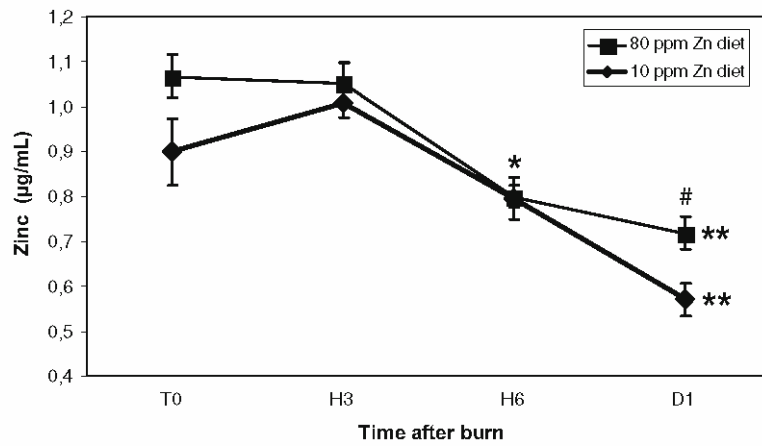
Before injury (T0), a significant lower zinc level (*p*<0.01) was observed in femur of zinc-deficient rats (79±1.5 μg g<sup>-1</sup>) compared to normal group (113.3±4.6 μg), whereas differences between the two groups did not reach the significance concerning plasma, liver, and muscle zinc concentrations (Table 1).

After burn injury, zinc plasma level decreased rapidly after the third hour in the two groups (Fig. 1). After 24 h, plasma zinc concentration was significantly lower in zinc-

**Table 1** Effect of Deficient Zinc Diet on Zinc Levels in Plasma and Organs Before Burn Injury

	Normal Zn diet NG (80 ppm)	Depleted Zn diet DG (10 ppm)	<i>p</i>
Plasma Zn level	1.06±0.11	0.89±0.18	0.065
Liver Zn level	35.9±8.0	27.4±3.1	0.065
Muscle Zn level	7.32±0.98	6.70±1.10	0.18
Femur Zn level	113±4.6	79±1.6*	0.002

Values (means±SD) are μg g<sup>-1</sup> wet weight for liver, muscle, and femur and μg mL<sup>-1</sup> for plasma. \*Values significantly different from normal diet group (*p*<0.01)



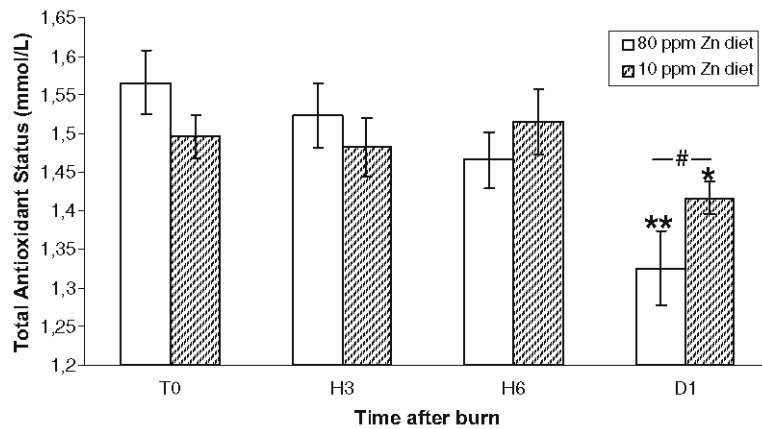
Data are presented as means ± SEM (n=5).  
 \*  $p < 0.05$  or \*\*  $p < 0.01$  compared to the control (T0).  
 #  $p < 0.05$  NG series (80 ppm) versus DG series (10 ppm).

Fig. 1 Evolution of zinc in plasma after burn injury

deficient rats ( $0.57 \pm 0.04 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) compared to control rats ( $0.72 \pm 0.04 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Zinc levels in muscle and liver were not altered significantly by the burn injury during this short period (data not shown).

Total Antioxidant Status

One day after burn injury, the TAS was significantly decreased in the rats of the two diet series ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2). This decrease was surprisingly more important in zinc-depleted animals.



Data are presented as means ± SEM (n=5).  
 \*  $p < 0.05$  or \*\*  $p < 0.01$  compared to the control (T0).  
 #  $p < 0.05$  NG series (80 ppm) versus DG series (10 ppm).

Fig. 2 Evolution of Total Antioxidant Status after burn injury



### Biochemical Parameters

Before burn injury, no difference was observed between the two groups concerning plasma biochemical parameters.

Plasma glucose, urea, and creatinine increased significantly as soon as the third hour after injury (Table 2) and remained elevated after 6 h. These values were normalized 24 h after injury with the exception of creatinine plasma levels that remained higher than before burn injury in DG rats. In parallel, the albumin plasma level decreased significantly and progressively during the first hours following injury, both in NG and DG series, to reach a nadir after 24 h.

### Hormonal Response

Corticosterone levels were similar in the two series before thermal injury (Fig. 3). Three hours after burn injury, a large plasma corticosterone release occurred ( $p=0.017$ ) in both groups (maximum of  $925.14 \pm 64.92$  ng L<sup>-1</sup> in DG rats) before returning to control values at H6 in NG rats. The dietary zinc restriction induced a biphasic response with a new significant increase of corticosterone level after 24 h ( $p=0.04$  compared to T0), whereas NG rats remained then within the normal range and was therefore significantly lower than in the DG rats ( $p=0.008$  after 24 h).

Within the first 6 h after burn injury, the plasma leptin secretion was statistically enhanced from  $0.94 \pm 0.24$  ng mL<sup>-1</sup> to a maximum of  $3.75 \pm 0.62$  ng mL<sup>-1</sup> in DG rats (Fig. 4). The day after, the leptin levels were normalized in the two groups compared to T0.

At baseline, no differences were observed between the two series concerning plasma insulin levels (Fig. 5). Significant plasma insulin peaks were observed at H6 in the two series compared to the controls at T0 ( $p=0.031$ ). The increase in plasma insulin level was then significantly higher in the DG rats compared to the NG rats ( $p=0.03$ ). Control values were reached again 24 h after the burn.

### Discussion

Previous studies reported the impairment of the trace element status after burn injury [15] and the benefits of micronutrient supplementation on the recovery of burn injury [24].

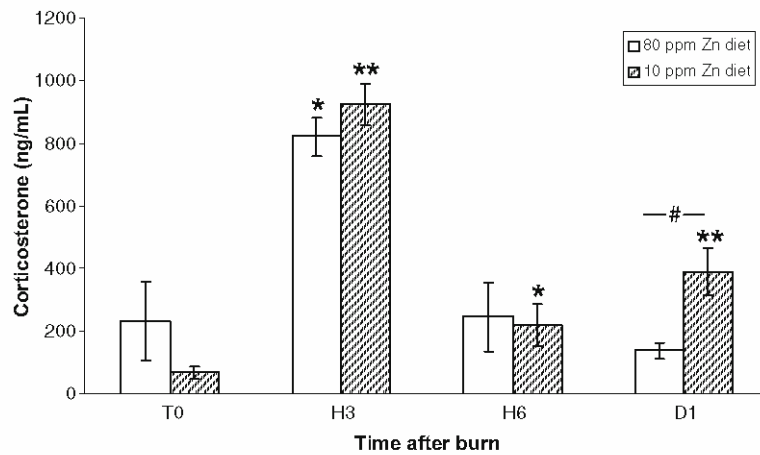
**Table 2** Plasma Biochemical Parameters in Burned Rats

		T0 (control)	H3	H6	D1
Glucose (mmol L <sup>-1</sup> )	NG	8.1±1.6	11.7±1.5*	11.6±1.2*	8.4±1.4
	DG	7.9±1.1	11.7±1.6*	13.3±2.**	8.2±2.5
Albumin (g L <sup>-1</sup> )	NG	41±1.4	34.5±1.3**	33±1.3**	30.5±2.6**
	DG	39±2.6	33.5±2.6**	34±1.5**	30.7±1.7**
Urea (mmol L <sup>-1</sup> )	NG	5.1±0.8	12.2±1.4**	12.1±2.3**	5.4±1
	DG	6.5±1.3	11.8±1**	13±2.3**	6.4±1.6
Creatinine (μmol L <sup>-1</sup> )	NG	27.8±6.5	39.8±10.6*	37.4±4.4*	26.2±4.1
	DG	23.7±3.1	39.2±6.5**	37.4±1.7**	29±5 *

Data are presented as means±SD ( $n=5$ )

NG normal group (with previous 80 ppm Zn diet); DG depleted group (with previous 10 ppm Zn diet)

\* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$  compared to the control (T0)



Data are presented as means  $\pm$  SEM (n=5).

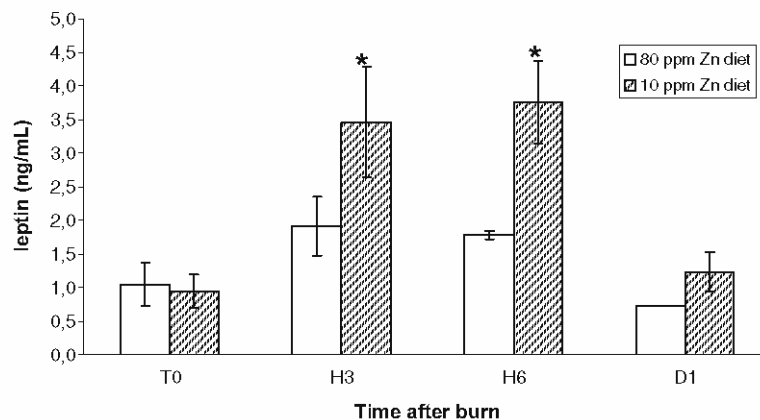
\*  $p < 0.05$  or \*\*  $p < 0.01$  compared to the control (T0).

#  $p < 0.05$  NG series (80 ppm) versus DG series (10 ppm).

Fig. 3 Evolution of corticosterone in plasma after burn injury

Among these trace elements, zinc seems to play a key role [16]. Despite its implication in noxious burn-induced insulin resistance, only one experimental study had investigated the impact of Zn status before injury on the recovery of burn injury [25].

In NG rats with an adequate zinc status, TAS decrease was significant 24 h after the burn injury. This observation fits with the impairment of antioxidant defenses classically described after the burn in animal models, such as thiol groups or glutathione changes [26], or antioxidant enzymes as glutathione peroxidase (GPx) or superoxide dismutase (SOD) activities [27]. These disorders lead to an oxidative burst monitored by the increase in lipoperoxide indices such as thiobarbituric acid reactive species [27, 28]. To avoid the deleterious consequences of such disorders in the body, observed as soon as the day after

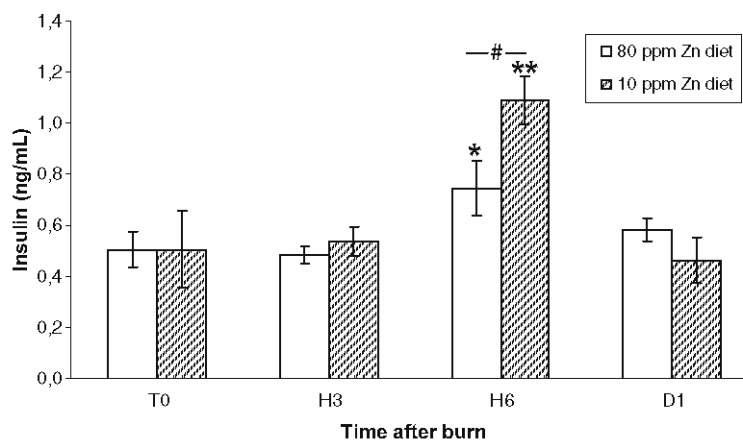


Data are presented as means  $\pm$  SEM (n=5).

\*  $p < 0.05$  or \*\*  $p < 0.01$  compared to the control (T0).

#  $p < 0.05$  NG series (80 ppm) versus DG series (10 ppm).

Fig. 4 Evolution of leptin in plasma after burn injury



Data are presented as means  $\pm$  SEM (n=5).  
 \*  $p < 0.05$  or \*\*  $p < 0.01$  compared to the control (T0).  
 #  $p < 0.05$  NG series (80 ppm) versus DG series (10 ppm).

Fig. 5 Evolution of insulin in plasma after burn injury

aggression, it appeared to us particularly prevailing to better understand the precocious mechanisms expanding during the first hour after burn injury in order to fight them and therefore avoid the expansion of oxidative disasters.

Early metabolic disturbances in glucose/insulin system were observed during the first hour after injury. In the present work, in agreement with other previous experimental studies [29], we observed an increase in plasma glucose of the 20% TBSA burned rats regardless of their zinc status before the burn injury. The observed rise of glycemia could be related to an increased rate of glucose production [30] in response to healing processes which increase the caloric needs: the energy is supplied by hepatic gluconeogenesis from glucose of muscular origin [31]. This early hyperglycemia, stimulated by glucocorticoid release, leads to insulin secretion. But, as classically described after burn [1, 29], in our experiment the glucose remained elevated in plasma of burned rats 6 h after injury, despite the significant increase in circulating insulin level. These results are consistent with the implementation of an insulin resistance. The mechanism of this insulin resistance involves the impairment of glucose transport into muscles after burn [32]. The molecular basis of the process appears related to alterations in postreceptor insulin signaling pathway. The tyrosine kinase activity of insulin receptor is consequently decreased and, therefore, the phosphorylation of insulin receptor substrate-1 is inhibited, leading to a decrease in translocation of GLUT-4. This factor is the insulin-regulated glucose transporter, which normally facilitates the passive diffusion of circulating glucose down its concentration gradient into muscle. Therefore, a decrease in translocation of GLUT-4 results in altered glucose transport into the muscle. Insulin resistance could also result from defects in glycogen synthase [33]. These molecular alterations of the glucose and insulin responses seem to be specific of the burn injury, and they have not been observed after septic shock [34]. In addition, the insulin resistance might be related to the influence of inflammatory cytokines since it has been reported that TNF- $\alpha$ , which is released in plasma of burned rats within the first hours after injury [34, 35], induces similar impairment of insulin response [32, 36].

The burn-induced insulin resistance leads also to disorders of protein metabolism such as protein breakdown of skeletal muscle. Our results confirm these changes in basal

metabolism, with the decrease in albumin in plasma during the first hours after injury, whereas urea and creatinine simultaneously increased. This protein catabolism is strengthened by the effect of stress hormones, as corticosterone which is early released, as soon as the third hour after burn. These metabolic disorders negatively influence the wound healing, the immune response, and the response to infection, compromising structure and function of essential organs such as muscles, skin, heart, and liver, and leading to increased morbidity and mortality in hospital [3, 37]. In addition, a supplementary detrimental effect of hyperglycemia is the increased production of mitochondrial SOD, in relation with the oxidative stress induced after burn injury [38].

Zinc status seems to modulate the response to burn injury. Our results indicate that zinc-deficient status increased the deleterious effects related to burn injury. During the first hours after burn, glucose and insulin levels were significantly higher in zinc-depleted rats compared to control rats. These data underline the role of zinc deficiency in insulin resistance processes. In addition, leptin secretion after 3 and 6 h appeared most important in deficient rats compared to normal-fed rats. This observation is possibly related to the difference in insulin resistance [39]. Zinc status influences insulin sensitivity and could counteract the insulin resistance [40]. Indeed, protein tyrosine phosphatase 1B activity, a key regulator of the phosphorylation state of the insulin receptor, is inhibited reversibly by low concentrations of zinc ions [41]. Therefore, the insulin signal transduction and the phosphatase cascade leading to translocation of the glucose transporter GLUT-4 are affected [40].

In this study, the zinc-depleted rats (DG) exhibited lowered bone reserves which worked towards controlling zinc levels in plasma, liver, and muscle. After the thermal injury, the zinc level decreased in plasma within less than 6 h. The plasma zinc decrease was more important in DG rats than in control rats (NG) as soon as day 1. These results partially fit with other studies reporting the early decrease of serum zinc level after burn injury [14, 15]. This modification of zinc metabolism could be related to the generalization of the burn-induced inflammatory response, glucocorticoid release, and albumin decrease. It is well documented that the burn injury induces early plasma IL-6 release [42–44], well known to stimulate the hepatic acute-phase response but also metallothionein gene expression through the JAK/STAT transduction pathway [45]. Concurrently, corticosterone which is particularly increased 3 h after thermal injury in both groups of rats is known to induce the hepatic synthesis of metallothioneins and therefore the transport of blood Zn to the hepatic compartments [46, 47]. How glucocorticoids stimulate metallothionein expression has been studied in the mouse and a specific receptor in the promoters of the genes coding for two metallothioneins has been identified now [48].

In conclusion, our data showed that burn injury leads in an animal model of thermal aggression to an early increase of glycemia and a decreasing insulin sensitivity. In zinc-deficient animals, this effect is emphasized. These data underline the interest of an early restoration of zinc status in burn injury. Controlling the zinc status could indeed limit the deleterious effects of oxidative stress and insulin resistance in patients, with clinical benefits in term of wound healing, immune functions, and hospitalization length. In this way, further experimentations are needed in order to study the eventual benefit of zinc supplementation at different doses on the described metabolism disorders.

**Acknowledgements** The authors thank D. Coulon and A. Zocaro for their excellent technical assistance. This experimental work was supported by a grant from “Délégation Générale à l’Armement” (France).

**Conflict of interest statement** The authors have no financial or proprietary interest in the subject matter.

 **Humana Press**

## References

1. Carter EA (1998) Insulin resistance in burns and trauma. *Nutr Rev* 56:S170–S176
2. Longarela A, Olarra J, Suarez L, Garcia de Lorenzo A (2000) Metabolic response to stress, can we control it. *Nutr Hosp* 15(6):275–279
3. Gore DC, Chinkes D, Hegggers J, Herndon DN, Wolf SE, Desai M (2001) Association of hyperglycemia with increased mortality after severe burn injury. *J Trauma* 51(3):540–544
4. Wu X, Thomas SJ, Herndon DN, Sanford AP, Wolf SE (2004) Insulin decreases hepatic acute phase protein levels in severely burned children. *Surgery* 135(2):196–202
5. Solomon V, Madihally S, Mitchell RN, Yarmush M, Toner M (2002) Antiproteolytic action of insulin in burn-injured rats. *J Surg Res* 105(2):234–242
6. Wolfe RR, Herndon DN, Jahoor F, Miyoshi H, Wolfe M (1987) Effect of severe burn injury on substrate cycling by glucose and fatty acids. *N Engl J Med* 317(7):403–408
7. Burke JF, Wolfe RR, Mullany CJ, Mathews DE, Bier DM (1979) Glucose requirements following burn injury. Parameters of optimal glucose infusion and possible hepatic and respiratory abnormalities following excessive glucose intake. *Ann Surg* 190(3):274–285
8. Anderson RA, Sandre C, Bryden NA, Agay D, Chancerelle Y, Polansky MM, Roussel AM (2006) Burn-induced alterations of chromium and the glucose/insulin system in rats. *Burns* 32(1):46–51
9. Quarterman J, Mills CF, Humphries WR (1966) The reduced secretion of, and sensitivity to insulin in zinc-deficient rats. *Biochem Biophys Res Commun* 25(3):354–358
10. Arquilla ER, Packer S, Tarmas W, Miyamoto S (1978) The effect of zinc on insulin metabolism. *Endocrinology* 103(4):1440–1449
11. Brun JF, Guinrand-Hugret R, Fons C, Carvajal J, Fedou C, Fussellier M, Bardet L, Orsetti A (1995) Effects of oral zinc gluconate on glucose effectiveness and insulin sensitivity in humans. *Biol Trace Elem Res* 47(1–3):385–391
12. Chen MD, Liou SJ, Lin PY, Yang VC, Alexander PS, Lin WH (1998) Effects of zinc supplementation on the plasma glucose level and insulin activity in genetically obese (ob/ob) mice. *Biol Trace Elem Res* 61(3):303–311
13. Coulston L, Dandona P (1980) Insulin-like effect of zinc on adipocytes. *Diabetes* 29(8):665–667
14. Selmanpakoglu AN, Cetin C, Sayal A, Isimer A (1994) Trace element (Al, Se, Zn, Cu) levels in serum, urine and tissues of burn patients. *Burns* 20(2):99–103
15. Bang RL, Mattappallil AB, Dashti HM, Al-Bader AA (2000) Thermal injury and changes in the trace elements. *J Trace Elem Exp Med* 13(1):255–264
16. Berger MM, Cavadini C, Bart A, Mansourian R, Guinhard S, Bartholdi I, Vandervale A, Krupp S, Chioloro R, Freeman J et al (1992) Cutaneous copper and zinc losses in burns. *Burns* 18(5):373–380
17. Holden JM, Wolf WR, Mertz W (1979) Zinc and copper in self-selected diets. *J Am Diet Assoc* 75(1):23–28
18. Abdulla M, Behbehani A, Dashti H (1989) Dietary intake and bioavailability of trace elements. *Biol Trace Elem Res* 21:173–178
19. Otsuka Y, Isomoto S, Noda H (2000) Dietary intake of trace elements in the general population, estimated from a regional nutritional survey, and comparison with recommended dietary allowances and tolerable upper intake levels. *Nippon Kosho Eisei Zasshi* 47(9):809–819
20. AREDS Research Group (2002) The effect of five-year zinc supplementation on serum zinc, serum cholesterol and hematocrit in persons randomly assigned to treatment group in the age-related eye disease study: AREDS Report No. 7. *J Nutr* 132:697–702
21. Walker HL, Mason AD Jr (1968) A standard animal burn. *J Trauma* 8(6):1049–1051
22. Arnaud J, Bellanger J, Bienvenu F, Chappuis P, Favier A (1986) Recommended method for assaying serum zinc with flame atomic absorption. *Ann Biol Clin* 44(1):77–87
23. Arnaud J, Chappuis P, Zawislak R, Jaudon MC, Bellanger J (1989) Determination of trace elements by an assay using flameless atomic absorption spectrometry. *Ann Biol Clin* 47(10):583–595
24. Berger MM, Spertini F, Shenkin A, Wardle C, Wiesner L, Schindler C, Chioloro RL (1998) Trace element supplementation modulates pulmonary infection rates after major burns: a double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* 68(2):365–371
25. Sandstead HH, Lanier VC Jr, Shephard GH, Gillespie DD (1970) Zinc and wound healing. Effects of zinc deficiency and zinc supplementation. *Am J Clin Nutr* 23(5):514–519
26. Ding HQ, Zhou BJ, Liu L, Cheng S (2002) Oxidative stress and metallothionein expression in the liver of rats with severe thermal injury. *Burns* 28(3):215–221

27. Sandre C, Agay D, Ducros V, Van Uye A, Cruz C, Chancerelle Y, Roussel AM (2004) Early evolution of selenium status and oxidative stress parameters in rat models of thermal injury. *J Trace Elem Med Biol* 17(4):313–318
28. Sabeh F, Baxter CR, Norton SJ (1995) Skin burn injury and oxidative stress in liver and lung tissues of rabbit models. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 33(6):323–328
29. Tang ZJ (1991) Alterations in insulin receptor in injured rats and the effects of dexamethasone and silybin. *Zhonghua Zheng Xing Shao Shang Wai Ke Za Zhi* 7(3):214–217
30. Wolfe RR, Durkot MJ, Allsop JR, Burke JF (1979) Glucose metabolism in severely burned patients. *Metabolism* 28(10):1031–1039
31. Carter EA, Tompkins RG, Burke JF (1988) Hepatic and intestinal blood flow following thermal injury. *J Burn Care Rehabil* 9(4):347–350
32. Ikezu T, Okamoto T, Yonezawa K, Tompkins RG, Martyn JA (1997) Analysis of thermal injury-induced insulin resistance in rodents. Implication of postreceptor mechanisms. *J Biol Chem* 272(40):25289–25295
33. Thorell A, Hirshman MF, Nygren J, Jorfeldt L, Wojtaszewski JF, Dufresne SD, Horton ES, Ljungqvist O, Goodyear LJ (1999) Exercise and insulin cause GLUT-4 translocation in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 277:E733–E741
34. Peter FW, Schuschke DA, Barker JH, Fleishcher-Peter B, Pierangeli S, Vogt PM, Steinau HU (1999) The effect of severe burn injury on proinflammatory cytokines and leukocyte behavior: its modulation with granulocyte colony-stimulating factor. *Burns* 25(6):477–486
35. Reyes R Jr, Wu Y, Lai Q, Mrizek M, Berger J, Jimenez DF, Barone CM, Ding Y (2006) Early inflammatory response in rat brain after peripheral thermal injury. *Neurosci Lett* 407(1):11–15
36. Hotamisligil GS (1999) The role of TNF $\alpha$  and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med* 245(6):621–625
37. Losser MR, Bernard C, Beaudeau JL, Pison C, Payen D (1997) Glucose modulates hemodynamic, metabolic, and inflammatory responses to lipopolysaccharide in rabbits. *J Appl Physiol* 83(5):1566–1574
38. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404(6779):787–790
39. Correia ML, Rahmouni K (2006) Role of leptin in the cardiovascular and endocrine complications of metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab* 8(6):603–610
40. Haase H, Maret W (2005) Protein tyrosine phosphatases as targets of the combined insulinomimetic effects of zinc and oxidants. *Biomaterials* 18(4):333–338
41. Haase H, Maret W (2003) Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin/insulin-like growth factor-1 signaling. *Exp Cell Res* 291(2):289–298
42. Agay D, Andriollo-Sanchez M, Claeyssen R, Touvard L, Denis J, Roussel A, Chancerelle Y (2008) Interleukin-6, TNF- $\alpha$  and interleukin-1 beta levels in blood and tissues in severely burned rats. *European Cytokine Network* 19:1–7
43. Yamada Y, Endo S, Inada K (1996) Plasma cytokine levels in patients with severe burn injury with reference to the relationship between infection and prognosis. *Burns* 22(8):587–593
44. Yeh FL, Lin WL, Shen HD, Fang RH (1999) Changes in circulating levels of interleukin 6 in burned patients. *Burns* 25(2):131–136
45. Lee DK, Carrasco J, Hidalgo J, Andrews GK (1999) Identification of a signal transducer and activator of transcription (STAT) binding site in the mouse metallothionein-I promoter involved in interleukin-6-induced gene expression. *Biochem J* 337:59–65
46. Cousins KJ (1985) Hormonal regulation of zinc metabolism in liver cells. in Mills CF, Bremner I, Chesters IK (eds) *Trace elements in man and animals*, Commonwealth Agricultural Bureaux, vol 5, pp 984–990
47. Beattie H, Bremner I (2000) Metallothioneins: their cellular function and relationship with zinc. In: Roussel AM, Anderson RA, Favier AE (eds) *Trace elements in man and animals*. Kluwer/Plenum, New York, pp 961–967
48. Kelly EJ, Sandgren EP, Brinster RL, Palmiter RD (1997) A pair of adjacent glucocorticoid response elements regulate expression of two mouse metallothionein genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(19):10045–10050



## 2. Intérêt de la supplémentation en zinc après agression thermique

Cette partie de notre travail a donné lieu à :

Un article publié dans « *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* » sous le titre « Toxic effects of iterative intraperitoneal administration of zinc gluconate in rats. » (*Andriollo-Sanchez, 2008a*)

Un article soumis à « *Journal of Biological Trace Element in Medicine & Biology* » sous le titre « Zinc supplementation in burned rats restores zinc status but fails to counteract burn-induced oxidative stress. »

### 2.1. Expérimentation III : Evaluation de la toxicité de la supplémentation en zinc par voie intrapéritonéale

#### 2.1.1. Objectifs

Le déficit d'apport en Zn est un problème nutritionnel connu qui affecte non seulement les pays en voie de développement, mais aussi les pays développés, indépendamment de l'âge, du sexe et de la race. Ce déficit souvent modéré (sub-déficit) semble être relativement bien toléré dans la population en bonne santé. Par contre, chez des patients traumatisés, il pourrait être particulièrement préjudiciable, notamment après une brûlure étendue qui exacerbe le déficit en Zn. Dans ce cas, un apport complémentaire en Zn, à des doses largement supérieures aux apports journaliers recommandés, est nécessaire. Cependant, le dosage et la forme galénique d'une telle supplémentation prêtent toujours à discussion en ce qui concerne les effets thérapeutiques et la toxicité potentielle. Chez le rat, la dose létale 50 (LD<sub>50</sub>) pour les sels de Zn, par voie orale, est comprise entre 237 et 623 mg/kg. La LD<sub>50</sub> en injection intrapéritonéale (IP) est de 28-73 mg/kg. Une étude récente a rapporté des effets toxiques lors d'injections répétées de Zn en IP de 4 et 8 mg/kg au niveau du système hématopoïétique et de paramètres biochimiques et endocriniens.

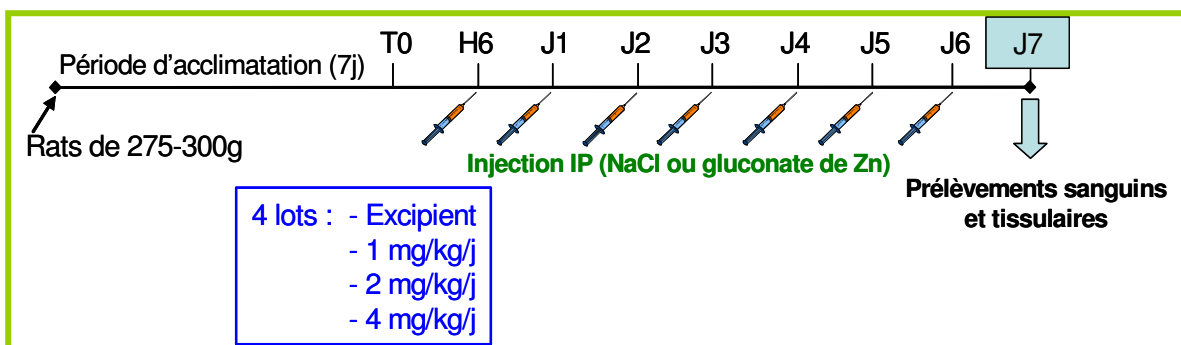
Par conséquent, avant d'étudier les bénéfices éventuels d'une supplémentation en Zn à haute dose, nous avons voulu définir la dose maximale qui peut être administrée en injections IP répétées, pendant sept jours, chez le rat, sans apparition d'effets secondaires. Nous avons, donc, étudié le statut en Zn et en Cu, des paramètres sanguins et l'évolution de la masse corporelle.



## 2.1.2. Protocole

Les protocoles de prélèvements tissulaires et de dosages sont décrits dans les annexes.

Quatre groupes d'animaux, non carencés et non brûlés, sont utilisés. Trois groupes ont reçu, respectivement, en IP, les doses de 1, 2 ou 4 mg/kg/j de gluconate de Zn, quotidiennement pendant sept jours. Un groupe sert de témoin (injection IP de sérum physiologique) (figure 31).



**Figure 31 : Procédure expérimentale de l'étude de tolérance à des injections intrapéritonéales de gluconate de zinc**

Les paramètres suivants ont été dosés :

Le Zn et le Cu plasmatiques, érythrocytaires, hépatiques et pancréatiques.

L'excrétion fécale quotidienne du Zn et du Cu.

La masse corporelle quotidienne des animaux.

La numération sanguine (érythrocytes, leucocytes, plaquettes, hémoglobine, hématocrite).

Des paramètres biochimiques sanguins (glycémie, créatinine, urée, cholestérol, aspartate aminotransférase (ALAT), alanine aminotransférase (ASAT), créatine kinase (CK), lactate déshydrogénase (LDH) et phosphatase alcaline (ALP)).

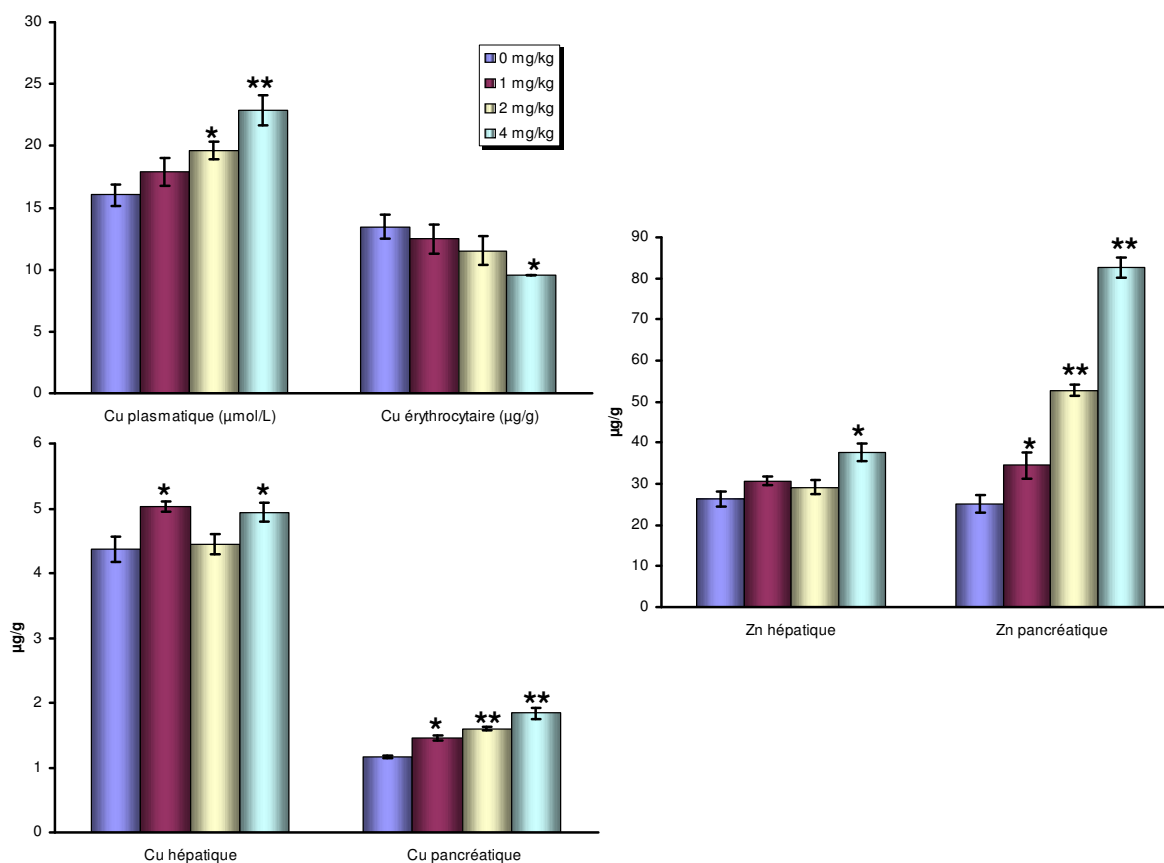
## 2.1.3. Principaux résultats

Le Zn plasmatique et érythrocytaire reste relativement stable à toutes les doses administrées. Par contre, les doses de 2 et 4 mg/kg de Zn induisent une augmentation de Cu plasmatique. La plus forte dose induit, en parallèle, une diminution (29%) du Cu érythrocytaire. Cette dose provoque également une augmentation du Zn et du Cu hépatique, respectivement de 42 et 13%. Une augmentation dose-dépendante du Zn et du Cu est observée dans le pancréas. L'augmentation pancréatique du Zn est très importante (plus de 200%) (figure 32). Enfin, au niveau des fèces, l'excrétion de Zn apparaît être dose-dépendante à partir du quatrième jour, contrairement au Cu qui n'évolue pas.

Ces résultats suggèrent que :

► L'homéostasie plasmatique du Zn résulte d'un transport vers le foie et le pancréas et d'une excrétion fécale de l'excès de Zn. Plus l'apport est important et plus le stockage pancréatique ainsi que l'élimination fécale augmentent.

► L'interférence qui existe entre le métabolisme du Zn et du Cu est à prendre en considération pour évaluer les effets toxiques d'un apport en Zn. Or, les doses de 2 et 4 mg/kg provoquent une modification de l'homéostasie en Cu dans le plasma, les érythrocytes et le pancréas.

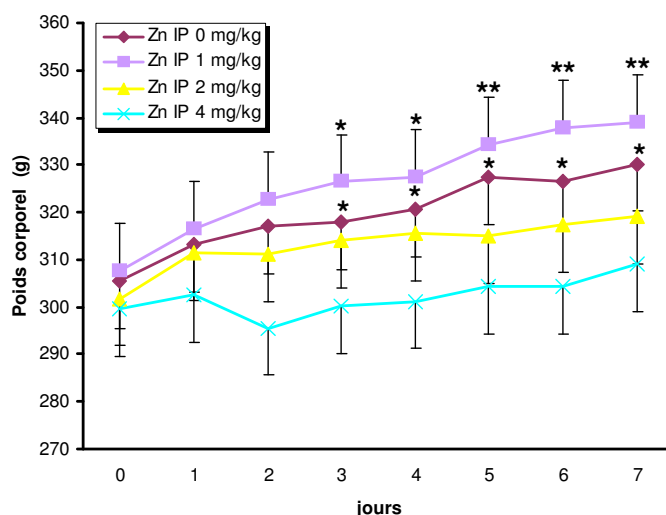


**Figure 32 : Effet - dose des injections en IP répétées (7 jours) de gluconate de Zn sur la concentration en cuivre du plasma, des érythrocytes, du foie et du pancréas et sur la concentration en Zn du foie et du pancréas.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM. \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$  : comparaison par rapport au groupe « témoin » (0 mg/kg).

A partir du deuxième jour, les rats « témoins » et les rats traités à la dose de 1 mg/kg montrent une augmentation significative de leur masse corporelle (**figure 33**). Les autres rats ne perdent pas de poids. A l'autopsie, les rats ayant reçu la plus forte dose présentent une péritonite congestive et un épaissement de la bordure des lobes hépatiques. Enfin, les signes cliniques d'une intoxication aiguë au Zn sont absents (diarrhée, alopecie, tachycardie...).

► La croissance corporelle des animaux à 1 mg/kg reflète leur bon état de santé. Les symptômes d'hépatite et de péritonite semblent indiquer une tolérance modérée à la dose de 4 mg/kg.



**Figure 33 : Effet des injections de Zn sur le poids corporel.**  
Les résultats sont exprimés en moyenne ± ESM. \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$  : comparaison par rapport à la valeur initiale (jour 0).

L'ensemble du système hématopoïétique n'est pas perturbé par les apports en Zn. Une modification des plaquettes à 2 mg/kg n'a pas été mis en relation avec un quelconque saignement, lors des prélèvements.

► L'absence de perturbations des paramètres sanguins n'est pas en accord avec la littérature qui trouve des effets toxiques, lors d'injections répétées à 4 mg/kg. Cependant, les effets hématologiques ne peuvent, ici, probablement pas être aperçus sur une période d'étude courte.

Les paramètres biochimiques étudiés ne sont pas modifiés par les injections IP de Zn quelle que soit la dose.

► Les fonctions cardiaques, hépatiques et rénales ne sont pas endommagées par la supplémentation en Zn jusqu'à la dose de 4 mg/kg.

## 2.14. Conclusions

L'injection en IP, durant une semaine, de 1 ou 2 mg/kg de gluconate de Zn n'entraîne pas d'effets secondaires. Ces doses semblent donc être appropriées lors de futurs essais thérapeutiques de supplémentation. Cependant, la dose de 2 mg/kg doit être utilisée avec prudence au vu de la modification du métabolisme du Cu et de la stagnation de la croissance corporelle et doit être considérée comme une dose limite. Seuls les organismes fortement carencés en Zn, qui pourront par conséquent métaboliser cet apport, peuvent recevoir le traitement à 2 mg/kg. La dose à 4 mg/kg est à proscrire suite aux effets secondaires décrits.

## 2.15. Article « Basic & Clinical pharmacology & toxicology »



## Toxic Effects of Iterative Intraperitoneal Administration of Zinc Gluconate in Rats

Maud Andriollo-Sanchez<sup>1,2</sup>, Richard Claeysen<sup>1,2</sup>, Josiane Arnaud<sup>2,3</sup>, Laurence Touvard<sup>1</sup>, Josiane Denis<sup>1</sup>, Yves Chancerelle<sup>1</sup>, Anne-Marie Rousselet<sup>2</sup> and Diane Agay<sup>1</sup>

<sup>1</sup>French Army Medical Research Center, 24 Avenue des Maquis du Grésivaudan, BP87, 38702 La Tronche cedex, France, <sup>2</sup>Laboratory of Fundamental and Applied Bioenergetics (LBFA), INSERM U884, Joseph Fourier University, BP53, 38041 Grenoble cedex 9, France, and

<sup>3</sup>Department of Integrated Biology, Grenoble University Hospital, BP217, 38043 Grenoble cedex 9, France

(Received December 19, 2007; Accepted February 14, 2008)

**Abstract:** Although zinc is an essential trace element involved in many physiological functions, toxicological data concerning acute exposure are scarce. The aim of our study was to determine the maximal iterative dose of zinc that can be administered in rats without any adverse effect. Saline (control group) or zinc gluconate at 1, 2 or 4 mg/kg were intraperitoneally injected in animals daily during 7 days. The tolerance of zinc treatments was evaluated by the observation of clinical symptoms, haematological parameters and biochemistry, in relation to the zinc and copper levels in blood, liver, pancreas and faeces. We found no serious adverse effect within 1 week in rats injected intraperitoneally with 1 or 2 mg/kg/day of zinc gluconate, which tends to indicate that those doses could be useful in future therapeutic research. In contrast, the therapeutic treatment of adult rats with repeated intraperitoneal injections of a 4 mg/kg/day zinc dose should be cancelled, due to the occurrence of clinical adverse effects within a few days, as intraperitoneal local intolerance or major growth underdevelopment.

Zinc is an essential trace element required for normal growth, reproductive functions or wound healing, as it participates in membrane stability and functioning of more than 300 cellular enzymes [1]. Latent zinc deficiency has become a worldwide nutritional problem that affects both developed and developing countries, independently of gender, age and race, in consequence of median intakes reported to be about 50–80% with regard to the recommended dietary allowances for each case [2]. This insidious zinc deficiency is more and more important to be kept in mind in pathophysiological processes that lead themselves to particularly enhanced micronutrient consumption, as for example in major burn injuries [3]. The burn patients indeed present acute trace element depletions as the result of extensive exudative losses, particularly in copper, zinc and selenium [4], and, therefore, a preliminary zinc deficiency may be particularly deleterious for the patient outcome.

Diet is the most important source of zinc but the zinc content in food is very low, and, in addition, many nutritional factors adversely affect its absorption [2]. In this context, previous studies have demonstrated that therapeutic trace element supplements are particularly beneficial in order to reduce overall infectious complications and shorter lengths of stay in intensive care unit [5]. The galenic form and the dosage of such therapeutic intakes are still discussed in relation to the known toxicity of trace elements and their therapeutic effects. The oral acute toxicity data, in human beings, rats and mice, most often used as dietary supplements

zinc compounds have shown that the amount of zinc that induces toxic effects is much higher than that contained in regular diets and that proposed in the dietary recommended daily allowances. Zinc oxide and zinc sulfate used for food fortification have several disadvantages. Zinc oxide is poorly absorbed and precipitates in liquid foods [6]. Zinc gluconate and zinc acetate have been reported to be relatively less irritating to the gastrointestinal tract, but zinc sulfate modifies food sensorial characteristics, rendering the flavour of food unpalatable. Hence, zinc gluconate appears to be the best form for oral therapeutic intake.

As much as zinc has multiple essential functions, it also has the potential to interact with at least many biological functions, inducing adverse effects. One of the established effects of chronic zinc toxicity is that oral zinc intakes, disproportionately high relative to copper, are a conditioning factor to induce copper deficiency [7]. In human beings, the multiple adverse effects include decreases in copper-dependent enzymes such as superoxide dismutase, ceruloplasmin and cytochrome *c* oxidase, and changes in immunological parameters, cholesterol and its lipoprotein distribution [8]. These findings indicate that excessive intake of zinc supplements is also a potential risk to human beings. Studies on rats have shown that excessive dietary zinc in these animals induces deficiencies of copper and iron, producing poor growth and anaemia [9,10]. In rats, the oral lethal dose 50 (LD<sub>50</sub>) for zinc salts is 237–623 mg/kg, the intraperitoneal injection LD<sub>50</sub> is 28–73 mg/kg and the inhalation LD<sub>50</sub> for zinc chloride is 2000 m<sup>3</sup> [11–13]. Another study has reported the apparition of toxic effects in rats, after iterative intraperitoneal injections with 4 or 8 mg/kg of zinc, on various tissues and organs relative to the haematopoietic system,

Author for correspondence: Diane Agay, CRSSA, 24 Avenue des Maquis du Grésivaudan, BP87, 38702 La Tronche cedex, France (fax +33 4 76 63 69 22, e-mail diane.agay@crssa.net).

cytogenetics, biochemistry and endocrine system function [14].

In burn injury contexts, studies on antioxidant trace elements alterations following thermal aggression remain too scarce despite the burst of oxidative stress in burn-injured human beings [15] and animals [16]. Indeed, the trace element status of the victims needs to be taken into account in regard to the involvement of trace elements in the anti-oxidant responses, inflammation processes, wound healing and immune response [17,18]. Given these crucial role in physiological processes, the variations of several trace elements in burn patients have been described in clinical studies [19,20], but clinical research protocols can not always be obtained because of the absence of sufficiently precise data on toxic effects of therapeutic high-dose intakes of trace elements in burned victims. In order to secondarily respond to this question in a severely burned rat experimental model, the first objective of our study was to evaluate the maximal doses of zinc administrated in rat by iterative intraperitoneal injection without inducing any adverse effects within 7 days.

### Materials and Methods

**Animals and treatment.** The animal experiment was performed in accordance with French ethical guidelines to minimize pain and suffering to the rats and approved by the Medical Committee of the French Army Medical Research Centre. Male Wistar rats, weighing about 250 g, were purchased from Charles River Laboratories (Les Oncins, France). The animals were acclimatized to their new environment for 1 week before the initiation of the treatment. Rats were housed according to the Agriculture and Environment Ministry standards at  $21 \pm 1^\circ$ , with a relative humidity of 55% and a 12-hr dark:light cycle, and were allowed food and water *ad libitum*. After a 1-week adaptation period, during which the rats were handled daily in order to get them used to the experimenters and to avoid later manipulation stress, 20 animals were randomly divided into four groups of rats: one normal control group (saline received) and three zinc groups treated by 1, 2 and 4 mg/kg per day of zinc gluconate. Saline or zinc gluconate were administered intraperitoneally every 24 hr during 7 days. The body weights were recorded at the beginning of the experiment and then every day before injection in order to adjust the zinc dose for each animal.

**Samples collection.** At the end of the study, on day 7, blood was collected under halothane anaesthesia by caudalis cava vena puncture using trace element-free S-Monovette syringes (Sarstedt Inc., Nümbrecht, Germany) with lithium heparin or ethylenediamine-

tetraacetic acid anticoagulant. Immediately after blood collection, the animals were killed by section of major chest vessels before tissue sampling. The liver and the pancreas were removed, weighed, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ$  until analysis.

**Biochemical assays.** Blood samples were centrifuged at  $2000 \times g$  for 15 min. The levels of plasma aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), cholesterol, creatine kinase (CK), creatinine, glycaemia, lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP) and urea were determined with an automatic analytical instrument (Hitachi 912, Roche Diagnostics, Meylan, France). The sample values were evaluated in comparison with quality controls for normal or pathological standards, Précinorm® U and PréciPath® U (Roche Diagnostics).

**Zinc and copper analysis.** Zinc and copper concentrations in erythrocyte, plasma, liver, pancreas and faeces were determined by flame atomic absorption spectrometry (Perkin-Elmer 560 model, Norwalk, CT, USA) using the previously described methods [21,22]. Plasma was diluted five times in hydrochloric acid 0.1 M, whereas organs were wet ashed with nitric acid 14 M. The ready to use 1 g/l zinc stock standard solution (Merck, Darmstadt, Germany) was used to prepare calibrants in the range of 1 to  $6 \mu\text{mol/l}$ . Seronorm® trace element serum (SERO AS, Billingstad, Norway) and NIST-SRM 1577b bovine liver powder (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) were used as internal quality control, respectively, for plasma and organs.

**Blood elements.** White blood cells, red blood cells, blood platelets, haematocrit and haemoglobin were determined using an automatic haematology analyser (Pentra 120, ABX Diagnostics, Montpellier, France). Samples analyses were performed after quality controls with ABX Minotrol 8-L (low), -N (normal) and -H (high) standards (Horiba ABX, Montpellier, France).

**Statistical analysis.** Results are expressed as means for five animals per group  $\pm$  S.E.M. The global course of each parameter was evaluated by an ANOVA on ranks (Kruskal-Wallis test), and then the comparison between the four groups were performed with non-parametric rank sum tests (Mann-Whitney tests) using Statistica software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Significance was considered at the level of  $P < 0.05$ .

### Results

#### Zinc and copper concentrations in blood.

The mean concentrations of blood zinc and copper in plasma and erythrocytes are shown in table 1. Concerning zinc concentrations, no significant difference was observed between the normal control group and the three zinc

Table 1.

Zinc (Zn) and copper (Cu) blood levels in rats.

Zn gluconate (mg/kg)	Plasma Zn concentration ( $\mu\text{g/g}$ )	Erythrocyte Zn concentration ( $\mu\text{g/g}$ )	Plasma Cu concentration ( $\mu\text{g/g}$ )	Erythrocyte Cu concentration ( $\mu\text{g/g}$ )
0	$19.04 \pm 2.16$	$185.60 \pm 4.49$	$16.04 \pm 0.86$	$13.44 \pm 0.96$
1	$16.16 \pm 1.10^a$	$192.80 \pm 4.80^a$	$17.92 \pm 1.13$	$12.48 \pm 1.18$
2	$18.24 \pm 0.54^a$	$173.60 \pm 4.49^b$	$19.60 \pm 0.70^1$	$11.52 \pm 1.18$
4	$22.20 \pm 2.85^b$	$199.20 \pm 7.84^a$	$22.88 \pm 1.19^2$	$9.60 \pm 0.00^1$

Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

<sup>a,b</sup>Mean values not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>Significant difference from the normal control group ( $P < 0.05$ ).

<sup>2</sup>Significant difference from the normal control group ( $P < 0.01$ ).

## TOXIC EFFECTS OF ZINC GLUCONATE IN RATS

269

Table 2.

Zinc (Zn) treatment effects on Zn and copper (Cu) levels in liver and pancreas.

Zn gluconate (mg/kg)	Liver Zn concentration ( $\mu\text{g/g}$ )	Liver Cu concentration ( $\mu\text{g/g}$ )	Pancreas Zn concentration ( $\mu\text{g/g}$ )	Pancreas Cu concentration ( $\mu\text{g/g}$ )
0	26.36 $\pm$ 1.83 <sup>a</sup>	4.37 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	25.12 $\pm$ 2.09	1.16 $\pm$ 0.02
1	30.76 $\pm$ 1.16 <sup>a</sup>	5.03 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	34.50 $\pm$ 3.20 <sup>a,1</sup>	1.45 $\pm$ 0.04 <sup>a,1</sup>
2	29.20 $\pm$ 1.68 <sup>a</sup>	4.45 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	52.78 $\pm$ 1.37 <sup>b,2</sup>	1.60 $\pm$ 0.03 <sup>b,2</sup>
4	37.63 $\pm$ 2.21 <sup>b,1</sup>	4.94 $\pm$ 0.15 <sup>b,1</sup>	82.74 $\pm$ 2.49 <sup>b,2</sup>	1.84 $\pm$ 0.09 <sup>b,2</sup>

Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.<sup>a,b</sup>Mean values not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).<sup>1</sup>Significant difference from the normal control group ( $P < 0.05$ ).<sup>2</sup>Significant difference from the normal control group ( $P < 0.01$ ).

groups, even if a significant increase of plasma zinc concentration was reported with the highest zinc dose compared to the 1 and 2 mg/kg zinc groups.

As blood zinc concentrations remained quite stable, the zinc intraperitoneal injection induced a dose-dependent increase of plasma copper concentration that was significant for 2 mg/kg of zinc ( $P < 0.05$ ) and 4 mg/kg of zinc ( $P < 0.01$ ) compared to the control group. The highest zinc dose induced a significant 29% decrease of erythrocyte copper concentration ( $P < 0.05$ ) as compared to the control group.

*Zinc and copper concentrations in organs.*

The effects of zinc treatment on zinc and copper concentrations in liver and pancreas are presented in table 2. Compared to the control group, the rats injected with the highest zinc dose displayed a significant increase of the zinc and copper concentrations in liver, +42% and +13%, respectively ( $P < 0.05$ ). In addition, a significant dose-dependent increase of zinc and copper concentrations was observed in pancreas, which is less important for copper compared to zinc concentrations.

*Zinc and copper levels in faeces.*

The quantities of zinc in faeces of intraperitoneally injected rats are shown in fig. 1. A dose-dependent excretion of zinc was observed on and after the fourth day of zinc supplementation. Concerning copper levels in faeces, no significant differences were observed between the control and the zinc-treated groups for the whole study (data not shown).

*Effect of zinc on clinical parameters.*

The body weight of rats, intraperitoneally administrated with zinc gluconate, is shown in fig. 2. From the second day, we observed a significant weight gain for the rats of control and 1 mg/kg zinc groups, whereas no weight gain was observed in the two other groups during the whole study. Furthermore, only for the highest zinc dose (4 mg/kg), the autopsy of the rats showed abnormal, abdominal organs on day 7 of the study, with the outcome of a congestive peritonitis and the thickening of the hepatic lobe borders.

*Effect of zinc on blood constituents.*

The effects of zinc treatments on blood constituents are shown in table 3. For doses under 4 mg/kg, no significant

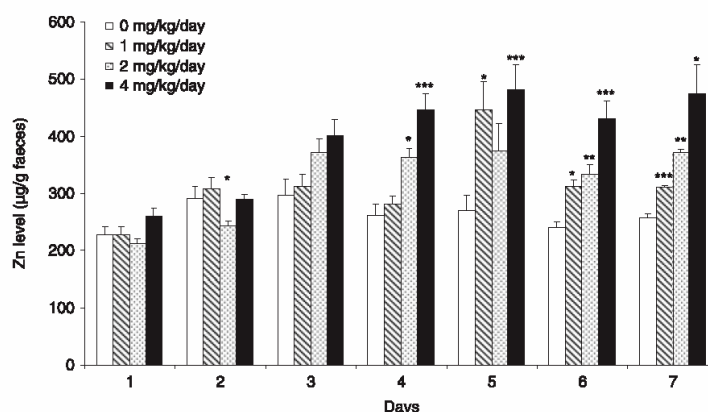


Fig. 1. Zinc (Zn) levels in faeces after intraperitoneal Zn treatment. Zn levels are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Significant difference from the normal control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

© 2008 The Authors

Journal compilation © 2008 Nordic Pharmacological Society. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 103, 267–272



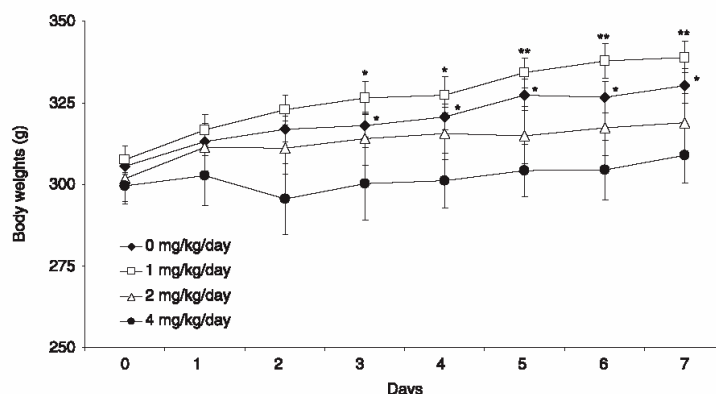


Fig. 2. Effect of intraperitoneal zinc treatment on body weight. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Significant difference from initial values at day 0, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

effects of zinc on white and red blood cells as well as haematocrit and haemoglobin were observed between the control and the zinc groups. Significantly higher platelet levels were observed after injections with 2 mg/kg of zinc compared to the control group, and after 2 and 4 mg/kg of zinc compared to the 1 mg/kg zinc group.

*Effect of zinc on biochemical parameters.*

The effects of zinc administration on biochemical parameters are shown in table 4. There were very few significant differences between the zinc groups and the normal control group. Only a significant hypoglycaemia (11% decrease) was observed after injection of 4 mg/kg of zinc compared to the control group ( $P < 0.05$ ). Furthermore, alkaline phosphatase was significantly increased after 1 mg/kg of zinc compared to the control group ( $P < 0.05$ ).

**Discussion**

As zinc is an essential trace element implicated in several major cell processes, zinc supplementation is more and more frequent in order to improve the natural defence pathway of the organism. Beside the debatable consumption of high

zinc doses in a self-medication context, the medical prescription of a high quantity of this trace element may raise several difficulties due to the particular sensitivity of weak patients, in relation to the observed acute and chronic toxicity of zinc [23]. To determine the toxicological bibliographical data, our study was designed to investigate the optimal dose of zinc therapeutically dispensable to rats by intraperitoneal recurrent administrations, without toxic effects on organ function. The intraperitoneal route was chosen over the intravenous route that appears to be the only route available during early resuscitation of severely burned patients. We also decided to study the effects of daily intraperitoneal injections of zinc gluconate on the functions of various organs in rats, with doses ranging from 1 to 4 mg/kg. The final aim of this study was to precise the experimental conditions of high-dose zinc supplementation in order to further estimate the benefit of therapeutic zinc support after a large burn injury in a rat model.

We first evaluated the impact of three doses of zinc, 1, 2 or 4 mg/kg, on the trace element status in rats. In our experiment, the plasma and erythrocyte zinc concentrations were not significantly different between the control group and the three zinc-treated groups (table 1), in accordance with a

Table 3.

Zinc treatment effects on blood constituents.

Zinc gluconate (mg/kg)	Red blood cells ( $10^6/\text{mm}^3$ )	White blood cells ( $10^3/\text{mm}^3$ )	Platelets ( $10^3/\text{mm}^3$ )	Haematocrit (%)	Haemoglobin (g/dl)
0	7.51 $\pm$ 0.12	7.56 $\pm$ 0.68	791 $\pm$ 38	41.1 $\pm$ 0.5	14.52 $\pm$ 0.19
1	7.62 $\pm$ 0.19	8.27 $\pm$ 0.55	793 $\pm$ 21 <sup>a</sup>	41.4 $\pm$ 1.1	14.71 $\pm$ 0.28
2	7.77 $\pm$ 0.11	9.43 $\pm$ 0.83	968 $\pm$ 40 <sup>b1</sup>	42.4 $\pm$ 0.5	15.19 $\pm$ 0.25
4	7.88 $\pm$ 0.25	7.74 $\pm$ 0.42	898 $\pm$ 27 <sup>b</sup>	41.0 $\pm$ 0.8	14.52 $\pm$ 0.31

Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

<sup>a,b</sup>Mean values not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>Significant difference from the normal control group ( $P < 0.05$ ).

## TOXIC EFFECTS OF ZINC GLUCONATE IN RATS

271

Table 4.

Zinc treatment effects on biochemical parameters.

Zinc gluconate (mg/kg)	AST (U/l)	ALT (U/l)	Cholesterol (mmol/l)	CK (U/l)	Creatinine ( $\mu$ mol/l)	Glycaemia (mmol/l)	LDH (U/l)	ALP (U/l)	Urea (mmol/l)
0	38 $\pm$ 3	65 $\pm$ 5	1.45 $\pm$ 0.08	325 $\pm$ 44	26 $\pm$ 2	10.63 $\pm$ 0.25	479 $\pm$ 92	120 $\pm$ 4	7.44 $\pm$ 0.21
1	33 $\pm$ 3	62 $\pm$ 4	1.29 $\pm$ 0.12	387 $\pm$ 39	25 $\pm$ 2	10.30 $\pm$ 0.13	534 $\pm$ 53	155 $\pm$ 11 <sup>1</sup>	7.42 $\pm$ 0.35
2	31 $\pm$ 3	48 $\pm$ 3	1.39 $\pm$ 0.08	391 $\pm$ 131	26 $\pm$ 1	10.92 $\pm$ 0.51	419 $\pm$ 155	114 $\pm$ 12	7.36 $\pm$ 0.23
4	35 $\pm$ 6	71 $\pm$ 9	1.31 $\pm$ 0.05	393 $\pm$ 33	26 $\pm$ 1	9.45 $\pm$ 0.39 <sup>1</sup>	422 $\pm$ 48	123 $\pm$ 12	7.20 $\pm$ 0.65

ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; CK, creatine kinase; LDH, lactate dehydrogenase. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

<sup>1</sup>Significant difference from the normal control group ( $P < 0.05$ ).

previous study on the consequences of the administration of 4 or 8 mg/kg of zinc acetate in rats [14]. The control of stable plasma values resulted from the transport of zinc to organ compartments, as liver or pancreas, and from the excretion in faeces of zinc excess. In our study, we also noticed a dose-dependent increase in zinc concentrations in pancreas (table 2), whereas the zinc excess that was not absorbed or stocked by the pancreas was excreted in faeces after the fourth day of the treatment (fig. 1). The stocking in pancreas of circulating zinc in excess and its elimination in faeces were the more important as the treatment dose increased, saturating the possibility of zinc metabolism regulation in the body.

In addition, one aspect of zinc toxicity is related to its interference with copper metabolism because of their similar chemical and biochemical properties [24,25]. Our results demonstrated that the experimental doses of 1 mg/kg of zinc had no adverse effect on copper metabolism. The increase of the zinc dose injected into the rats, 2 to 4 mg/kg, led to a dose-dependant increase of copper levels in plasma (table 1) and in pancreas (table 2), without any effect on copper excretion in faeces (data not shown). Moreover, the highest dose of zinc provoked significantly lower copper concentration in erythrocytes and higher copper concentration in the liver. Adverse effects on copper homeostasis were also equally marked as the zinc treatment dose increased up to 1 mg/kg, in agreement with previous studies that have shown that the copper status of rats was compromised when they consumed a high zinc diet [26,27].

On the other side, we observed the clinical signs in the treated rats in order to evaluate zinc treatment tolerance. As expected, the severe symptoms of acute toxicity of zinc such as tachycardia, vascular shock, nausea, vomiting, diarrhoea and signs in relation to pancreatic and hepatic parenchymal damage [12,13,23] were not observed in the rats treated with 1, 2 or 4 mg/kg intraperitoneal zinc gluconate. In rats, neither weight gain nor weight loss was observed with 2 or 4 mg/kg zinc treatment, demonstrating no adverse effects with those doses (fig. 2). In addition, a weight gain was observed for the 1 mg/kg zinc group within 4 days, reflecting the well-being of the animals with this dose as compared to growth curve of the controls. In addition, within 7 days, no effect of zinc treatment was observed on white and red blood cell counts in any treatment group (table 3), even if

the toxic effect on the haematopoietic system has been already described after a zinc sulfate iterative administration at 4 mg/kg dose [14], but haematological effects would probably not be revealed in such a short observation period. Moreover, we noticed a higher number of platelets for the 2 mg/kg/day zinc gluconate group compared to controls, even if no major bleeding sign was observed when the animals were sampled. The autopsy of the rats on the seventh day after the beginning of the treatment confirms these results, because we did not notice any organ lesion in the rats of the 1 or 2 mg/kg zinc groups. Only the 4 mg/kg treated animals presented acute peritonitis and hepatitis symptoms in relation to the moderate tolerance of zinc injected as higher quantities.

These clinical observations are quite consistent with the interpretation of the explored biochemical parameters. In our study, the stability of the ALT, AST, LDH and CK levels in the three zinc groups compared to the control rats (table 4) indicated that the hepatic and cardiac functions were not damaged after a daily treatment with zinc gluconate at a 4 mg/kg dose [28], in accordance with a previous study that showed a significant decrease in AST only after 8 mg/kg zinc treatment, but not in the 4 mg/kg zinc group [14]. Finally, as the blood urea and creatinine levels did not fall in any group, we did not notice any renal dysfunction until the 4 mg/kg dose of zinc gluconate, although these results are inconsistent with other studies [10].

In addition, zinc plays a key role as constituent of about 200 metalloenzymes, such as ALP that was the first Zn enzyme to be discovered, and in which three closely spaced metal ions are present at the active centre [29]. Our study demonstrated that ALP activity is only moderately increased after the lowest zinc dose ( $P < 0.05$ ), but this was an isolated observation. No effect on ALP activity was observed with the higher zinc doses, even if such high input of zinc allowed the stocking of excessive zinc in pancreas, in contradiction with others studies reporting that high zinc supplementation increases the activity of ALP in plasma [30,31].

In conclusion, we found no serious adverse effect within 1 week on rats injected intraperitoneally with 1 or 2 mg/kg/day of zinc gluconate, which tends to indicate that those doses could be used for future therapeutic research. Daily intraperitoneal injection of zinc gluconate salt, until 1 mg/kg,

is well tolerated and could be safely used in male Wistar rats without acute toxic effect. After a 2 mg/kg/day treatment, the outcome of the flagging of the growth curve and the modifications of platelet count must push us to be careful and to consider this dose as a limit. Beyond, as underlined by previous studies [14], the therapeutic treatment of adult rats with repeated intraperitoneal injections at a 4 mg/kg zinc dose should be cancelled, due to clinical adverse effects within a few days, such as intraperitoneal local intolerance or major growth underdevelopment.

#### Acknowledgements

The authors thank D. Coulon and A. Zocaro for their excellent technical assistance. This work was supported by a grant from Délégation Générale à l'Armement (France).

#### References

- Vallee BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 1993;73:79–118.
- Sandstead HH, Smith JC Jr. Deliberations and evaluations of approaches, endpoints and paradigms for determining zinc dietary recommendations. *J Nutr* 1996;126:S2410–18.
- Berger MM, Shenkin A. Trace elements in trauma and burns. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998;1:513–7.
- Berger MM, Cavadini C, Chioloro R, Guinchard S, Krupp S, Dirren H. Influence of large intakes of trace elements on recovery after major burns. *Nutrition* 1994;10:327–34.
- Berger MM, Spertini F, Shenkin A, Wardle C, Wiesner L, Schindler C *et al.* Trace element supplementation modulates pulmonary infection rates after major burns: a double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* 1998;68:365–71.
- Allen LH. Zinc and micronutrient supplements for children. *Am J Clin Nutr* 1998;68:S495–8.
- Welkell JC, Shearer KD, Gauglitz EJ. Zinc supplementation of trout diets: tissue indicators of body zinc status. *Prog Fish-Cult* 1986;48:205–12.
- Klevay LM, Inman L, Johnson LK, Lawler M, Mahalko JR, Milne DB *et al.* Increased cholesterol in plasma in a young man during experimental copper depletion. *Metabolism* 1984;33:1112–8.
- Calesnick B, Dinan AM. Zinc deficiency and zinc toxicity. *Am Fam Physician* 1988;37:267–70.
- Llobet JM, Domingo JL, Colomina MT, Mayayo E, Corbella J. Subchronic oral toxicity of zinc in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 1988;41:36–43.
- Karlsson N, Fångmark I, Häggqvist I, Karlsson B, Rittfeldt L, Marchner H. Mutagenicity testing of condensates of smoke from titanium dioxide/hexachloroethane and zinc/hexachloroethane pyrotechnic mixtures. *Mutat Res* 1991;260:39–46.
- World Health Organization. Environmental Health Criteria 221: Zinc. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2001.
- Maret W, Sandstead HH. Zinc requirements and risks and benefits of zinc supplementation. *J Trace Elem Med Biol* 2006;20:3–18.
- Piao F, Yokoyama K, Ma N, Yamauchi T. Subacute toxic effects of zinc on various tissues and organs of rats. *Toxicol Lett* 2003;145:28–35.
- Roth E, Manhart N, Wessner B. Assessing the antioxidative status in critically ill patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004;7:161–8.
- Zhang C, Sheng ZY, Hu S, Gao JC, Li JY, Liu JY. The role of oxygen-free radical in the apoptosis of enterocytes in scalded rats after delayed resuscitation. *J Trauma* 2004;56:611–7.
- Berger MM. Role of trace elements and vitamins in perioperative nutrition. *Ann Fr Anesth Reanim* 1995;14:82–94.
- Roussel AM, Anderson RA, Favier AE (eds). Trace Elements in Man and Animals 10. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000.
- Peck MD, Chang Y. Nutritional support for burn injuries. *J Nutr Biochem* 1999;10:380–96.
- Selmanpakoglu AN, Cetin C, Sayal A, Isimer A. Trace element (Al, Se, Zn, Cu) levels in serum, urine and tissues of burn patients. *Burns* 1994;20:99–103.
- Arnaud J, Bellanger J, Chappuis P, Favier A, Galliot M. Recommendations for the assay of serum copper by flame atomic absorption spectrometry. *Ann Biol Clin* 1985;43:297–318.
- Arnaud J, Bellanger J, Bienvenu F, Chappuis P, Favier A. Recommended method for assaying serum zinc with flame atomic absorption. *Ann Biol Clin* 1986;44:77–87.
- Salgueiro MJ, Zubillaga M, Lysionek A, Sarabia MI, Caro R, De Paoli T *et al.* Zinc as an essential micronutrient: a review. *Nutr Res* 2000;20:737–755.
- Barone A, Ebesh O, Harper RG, Wapnir RA. Placental copper transport in rats: effects of elevated dietary zinc on fetal copper, iron and metallothionein. *J Nutr* 1998;128:1037–41.
- Lönnerdal B. Bioavailability of copper. *Am J Clin Nutr* 1996;126:S821–9.
- Ogiso T, Moriyama K, Sasaki S, Ishimura Y, Minato A. Inhibitory effect of high dietary zinc on copper absorption in rats. *Chem Pharm Bull* 1974;22:55–60.
- Sun JY, Jing MY, Weng XY, Fu LJ, Xu ZR, Zi NT *et al.* Effects of dietary zinc levels on the activities of enzymes, weights of organs, and the concentrations of zinc and copper in growing rats. *Biol Trace Elem Res* 2005;107:153–65.
- Lee TH, Goldman L. Serum enzyme assays in the diagnosis of acute myocardial infarction. Recommendations based on a quantitative analysis. *Ann Intern Med* 1986;105:221–3.
- Coleman JE. Structure and mechanisms of alkaline phosphatase. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1992;21:441–83.
- Anna F, Miller ER, Ku PK, Ullrey DE. Effect of elevated dietary zinc on growth performance of weaning swine. *Michigan State Univ Rep Swine Res* 1992;520:128–32.
- Xu ZR, Wang MQ. Approach of the mechanism of growth promoting effect of pharmacological level of zinc in pigs. *Acta Vet Zootech Sin* 2001;32:11–17.

## 2.2. Expérimentation IV : Effet de la supplémentation en zinc sur le stress oxydant induit par la brûlure

### 2.2.1. Objectifs

Les éléments-trace prennent une place grandissante dans l'arsenal thérapeutique utilisé en unité de soins intensifs, en particulier chez les grands brûlés. En effet, les patients brûlés sont particulièrement exposés à une perte massive d'éléments-trace, en raison de la disparition de la barrière cutanée. Or, l'implication de ces éléments au niveau du système antioxydant, de l'immunité, de la réparation tissulaire a été largement démontrée. Cependant, comme nous l'avons souligné précédemment, les traitements supplétifs restent empiriques.

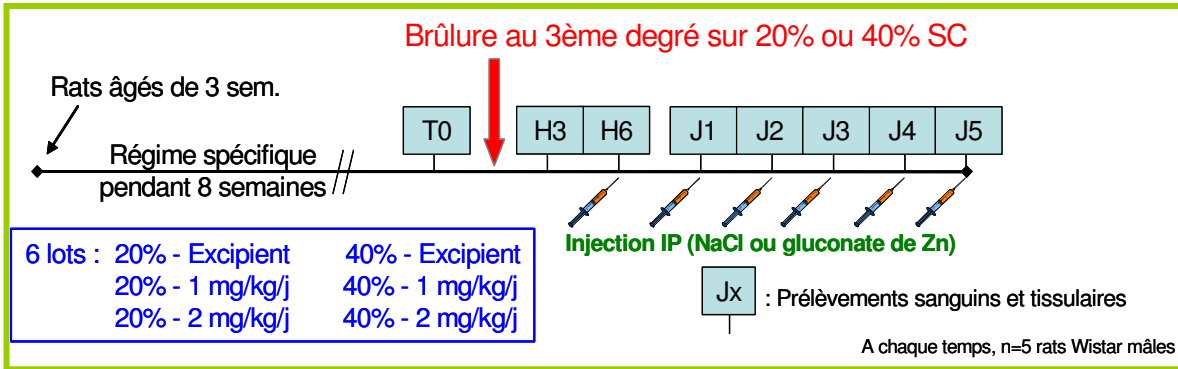
Nos expériences précédentes ont montré l'intérêt de restaurer et réguler le statut en Zn. Mais, nous avons également mis en évidence que l'apport en Zn à fortes doses ne peut pas être considéré comme un geste anodin.

Notre objectif a donc été d'évaluer les conséquences d'une supplémentation en Zn, à doses élevées, chez des rats brûlés, étant préalablement carencés en Zn afin de se rapprocher du statut subdéficient des patients admis dans les Centres de Traitements des Brûlés. Les effets thérapeutiques d'un tel apport ont été évalués par l'étude de la restauration du statut en Zn en relation avec le statut en Cu, ainsi que par l'évolution du statut oxydant, des enzymes antioxydantes et des paramètres biochimiques plasmatiques.

### 2.2.2. Protocole

Les protocoles de brûlure, de prélèvements tissulaires et de dosages sont décrits en annexe.

Les rats reçoivent un régime carencé en Zn (10 ppm), pendant huit semaines, avant d'appliquer une brûlure sur 20 % ou 40 % de la surface corporelle. Un lot de cinq rats permet de déterminer les valeurs initiales (T0), après la mise en place de la carence. Les rats brûlés sur 20 % SC sont prélevés à six heures (H6), un jour (J1), deux jours (J2), trois jours (J3), quatre jours (J4) et cinq jours (J5) après la brûlure. Les rats brûlés sur 40 % sont prélevés à J1, J3 et J5. Pour chaque jour de prélèvements, il y a trois groupes de rats : deux groupes traités recevant respectivement 1 et 2 mg/kg de gluconate de Zn en intrapéritonéale (IP), six heures après la brûlure puis quotidiennement jusqu'au sacrifice et un groupe « non traité » recevant, dans les mêmes conditions, du sérum physiologique en IP (**figure 34**).



**Figure 34 : Procédure expérimentale de l'étude sur les effets d'un apport en zinc après brûlure**

Les paramètres suivants ont été évalués :

Le statut en Zn et en Cu plasmatique, hépatique, rénal et intestinal.

Des défenses antioxydantes :

- Les groupements thiols non oxydés (SH) plasmatiques.
- Le glutathion total (GSH) plasmatique.
- La glutathion peroxydase (GPx) et la superoxyde dismutase (SOD) sanguines, hépatiques, rénales et musculaires.
- Le statut antioxydant total (TAS)

Des paramètres de biologie générale :

- Des paramètres biochimiques sanguins (créatinine (CR), urée, aspartate aminotransférase (ALAT), alanine aminotransférase (ASAT), créatine kinase (CK), lactate déshydrogénase (LDH)).
- Le taux d'hémoglobine.
- La concentration protéique dans les homogénats tissulaires.

### 2.2.3. Résultats

Les désordres biochimiques, les modifications des niveaux plasmatiques et hépatiques en Zn ainsi que la dépression des défenses antioxydantes (chute du TAS, du GSH et des groupements SH) sont plus marqués dans le groupe 40 %.

► La comparaison de ces paramètres, collectés chez les animaux brûlés non traités, souligne l'importance de la sévérité de la brûlure sur l'évolution du dysfonctionnement des fonctions métaboliques.

Les animaux traités n'ont pas présenté de tachycardie, de problèmes digestifs ou, lors de l'autopsie, de lésions péritonéales, hépatiques ou rénales.

► Les signes cliniques d'une intolérance au Zn ne sont pas observés aux doses utilisées.

ALT et AST montrent une évolution comparable. Leurs concentrations plasmatiques augmentent rapidement pour attendre un pic à J1, de manière plus marquée dans les groupes 40 % que dans les groupes 20 %. Par la suite, les niveaux diminuent progressivement jusqu'à J5. Les injections intrapéritonéales de Zn permettent une décroissance plus rapide de ALT trois jours (20 %) ou cinq jours (40 %) après la brûlure. Par contre, le traitement aggrave le relargage de AST chez les rats 40 % à J1 (figure 35).

Après un pic très précoce, CK retrouve un niveau similaire à T0 dès J1. Cependant, comme pour AST, l'administration de Zn induit un relargage accru de cette enzyme à J3 (groupe 20 et 40 %). La même situation est observée pour la LDH (figure 35).

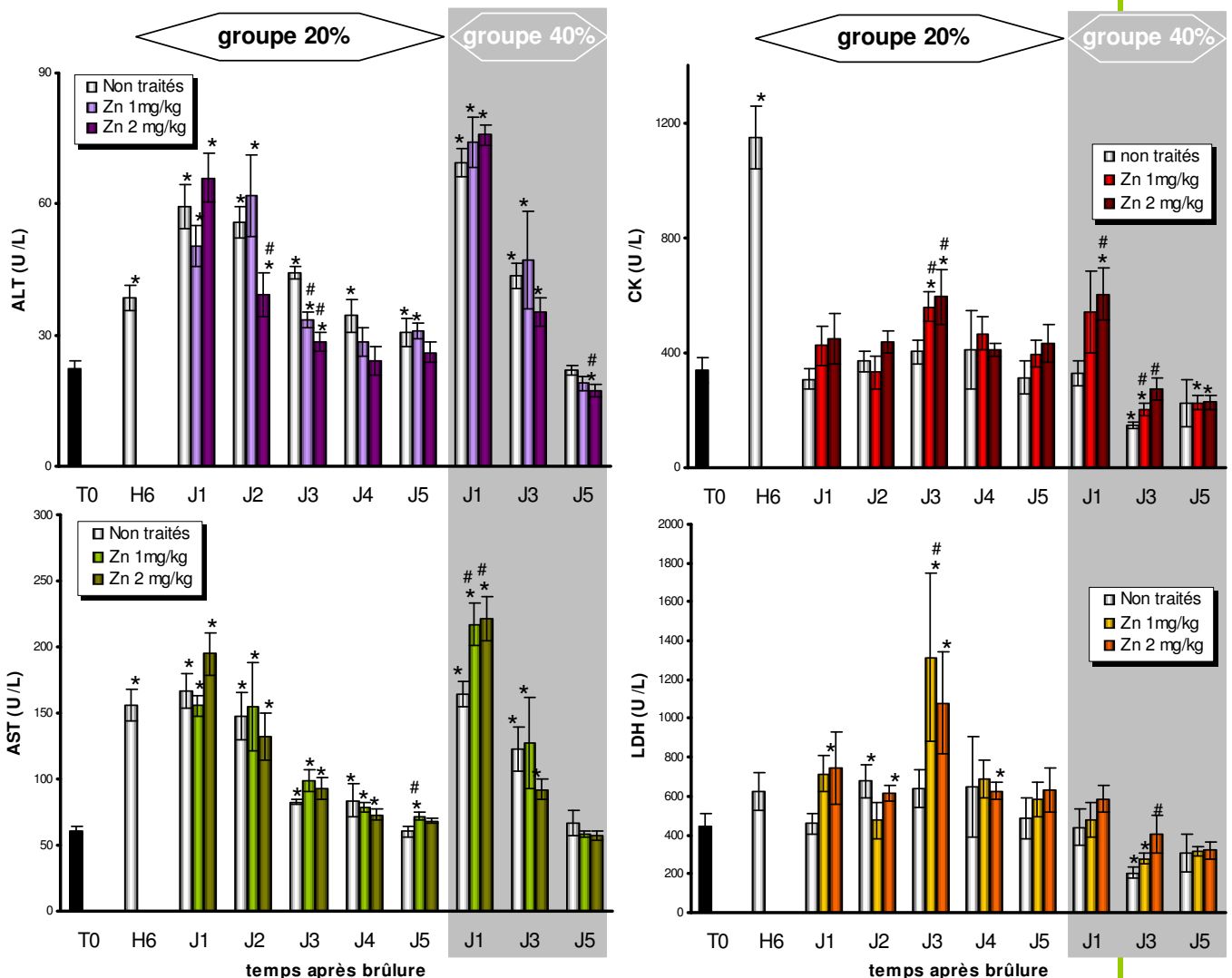


Figure 35 : Evolution de paramètres biochimiques sanguins (ALT; AST; CK; LDH), chez les rats traités ou non par des injections de Zn, après brûlure de 20% ou 40%.

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM. \*  $p < 0.05$  : comparaison à T0. #  $p < 0.05$  : rats traités versus rats non traités, le même jour.

L'urée présente un pic à H6 chez les groupes 20 %. Sa concentration se normalise à J1 avant d'augmenter à nouveau, de manière progressive, jusqu'à J5. Le pic précoce est plus important chez les groupes 40 % et reste présent à J1. La CR montre également une augmentation transitoire à H6 qui se prolonge à J1 chez les rats 40 %. Le traitement n'induit pas de changement dans les concentrations en urée et en CR.

► L'évolution des paramètres biochimiques ne met pas en évidence de problèmes majeurs quant à l'utilisation des apports en Zn aux doses choisies. En effet, la cinétique similaire observée pour ALT, l'urée et CR entre les animaux traités ou non prouve l'absence de toxicité hépatique ou rénale. Les différences significatives, entre animaux traités et non traités, au niveau de AST, CK et LDH soulignent une souffrance tissulaire due aux traitements, en particulier au niveau musculaire. Cependant, elles doivent être prises avec précaution car elles apparaissent modérées, ponctuelles et rares.

Comme observé précédemment, la brûlure entraîne une chute du Zn plasmatique qui reste, en l'absence de traitement, en dessous de la valeur initiale durant plusieurs jours. Les injections répétées de Zn permettent, par contre, de retrouver plus rapidement la concentration initiale de cet élément-trace, voire de la dépasser avec la dose de 2 mg/kg (**figure 36**).

Contrairement à ce qui est observé dans le compartiment sanguin, les concentrations hépatiques en Zn augmentent après brûlure. Les traitements amplifient ce phénomène de manière proportionnelle à la dose injectée (**figure 36**).

Dans d'autres organes, tels que les reins et l'intestin mais aussi les os et les muscles (non présentés), les niveaux de Zn sont plus stables après la brûlure. Les traitements entraînent une augmentation des concentrations en Zn dans les reins et l'intestin, ponctuelle à 1 mg/kg (J3 et J4) ou plus large à 2 mg/kg (**figure 36**).

Les apports en Zn permettent de limiter, de manière ponctuelle, les augmentations du Cu plasmatique, érythrocytaire et hépatique. Le Cu intestinal enregistre une augmentation à J4 et J3, respectivement chez les groupes 20 % et 40 %. Le Cu rénal, osseux et musculaire n'est pas modifié par les traitements.

► Les apports en Zn à 1 mg/kg et 2 mg/kg induisent une modification majeure du statut en Zn dans le plasma et les tissus. Cette modification est caractérisée par une rétention du Zn dans l'organisme, malgré les pertes importantes, consécutives à la supplémentation, préalablement décrites au niveau des fèces. Cet effet pourrait être plus ou moins désirable selon les tissus :

- Au niveau plasmatique et érythrocytaire, cette rapide augmentation des concentrations en Zn après la supplémentation peut être considérée comme bénéfique car elle permet de compenser la dépression en Zn observée chez les brûlés.

- Au niveau intestinal et rénal, même si un réajustement du Zn n'apparaît pas nécessaire après la brûlure, l'augmentation du statut en Zn ne semble pas délétère au vu de l'absence de paramètres biochimiques alarmants.

- Au niveau hépatique, les traitements intensifient la rétention de Zn induite par la brûlure. Ce phénomène ne provoque pourtant pas de lésions de l'organe puisqu'il n'entraîne pas le relargage d'ALT, voire permet un retour plus rapide à la normale.

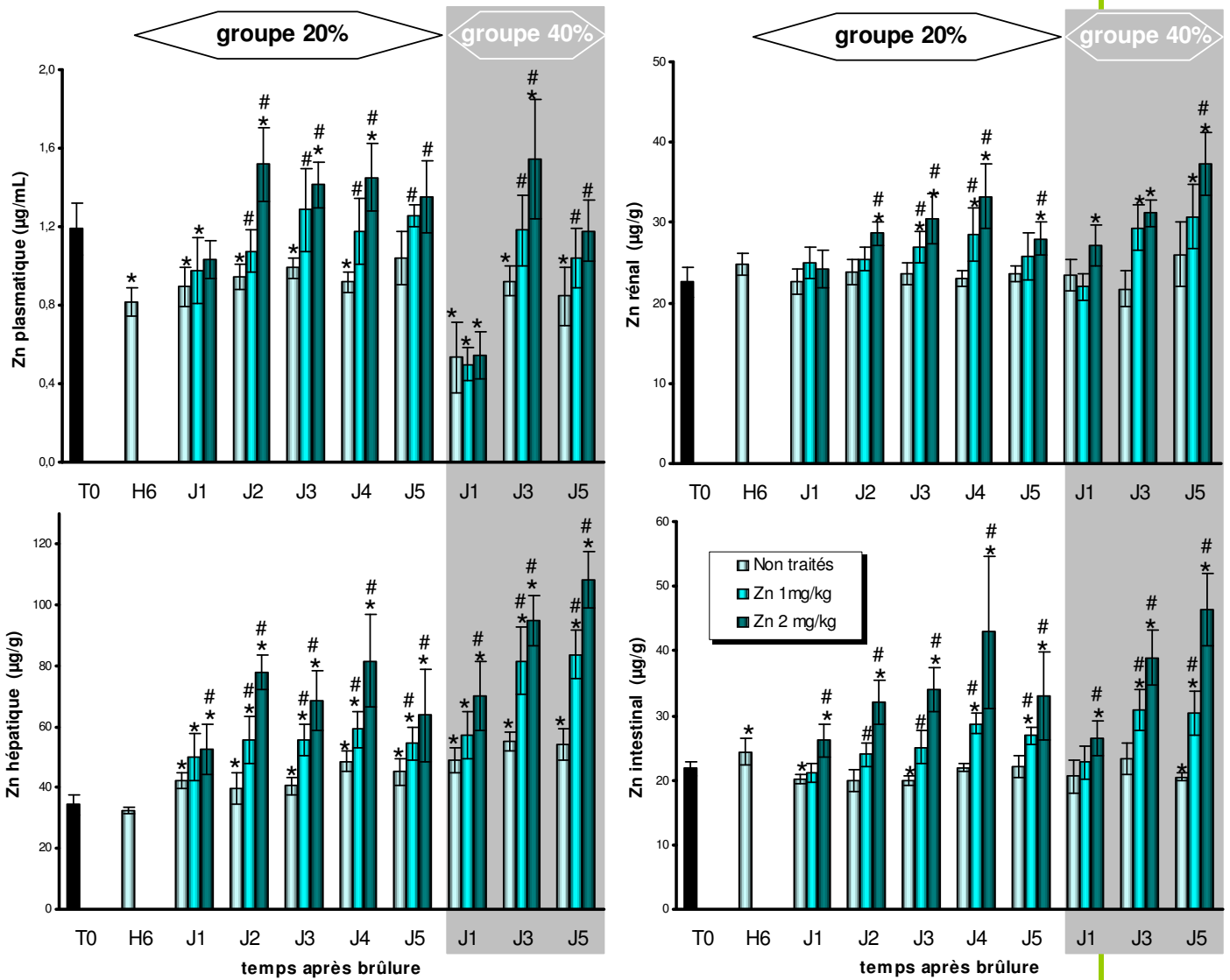
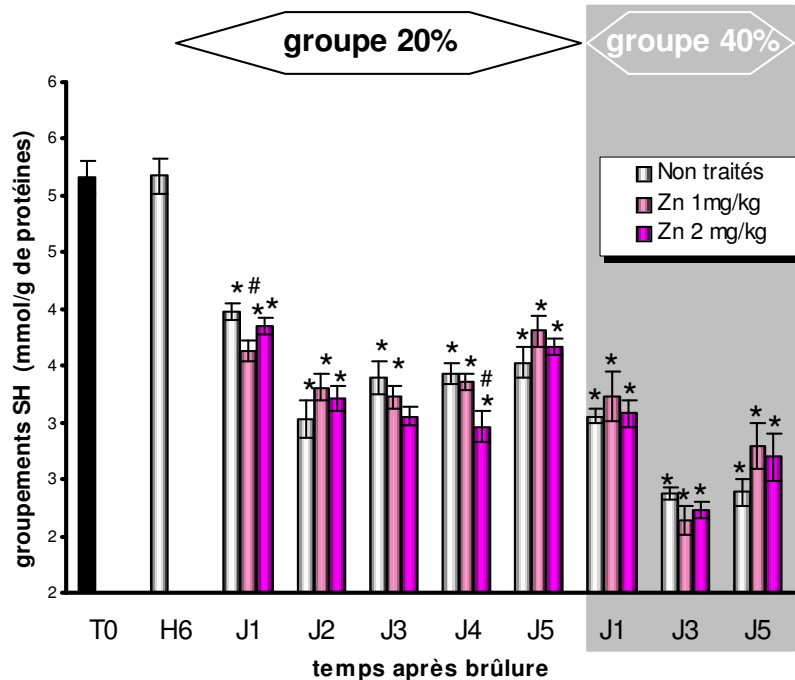


Figure 36 : Evolution des concentrations plasmatiques et tissulaires, chez les rats traités ou non par des injections de Zn, après brûlure à 20% ou 40%. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  : comparaison à T0. #  $p < 0.05$  : rats traités versus rats non traités, le même jour.



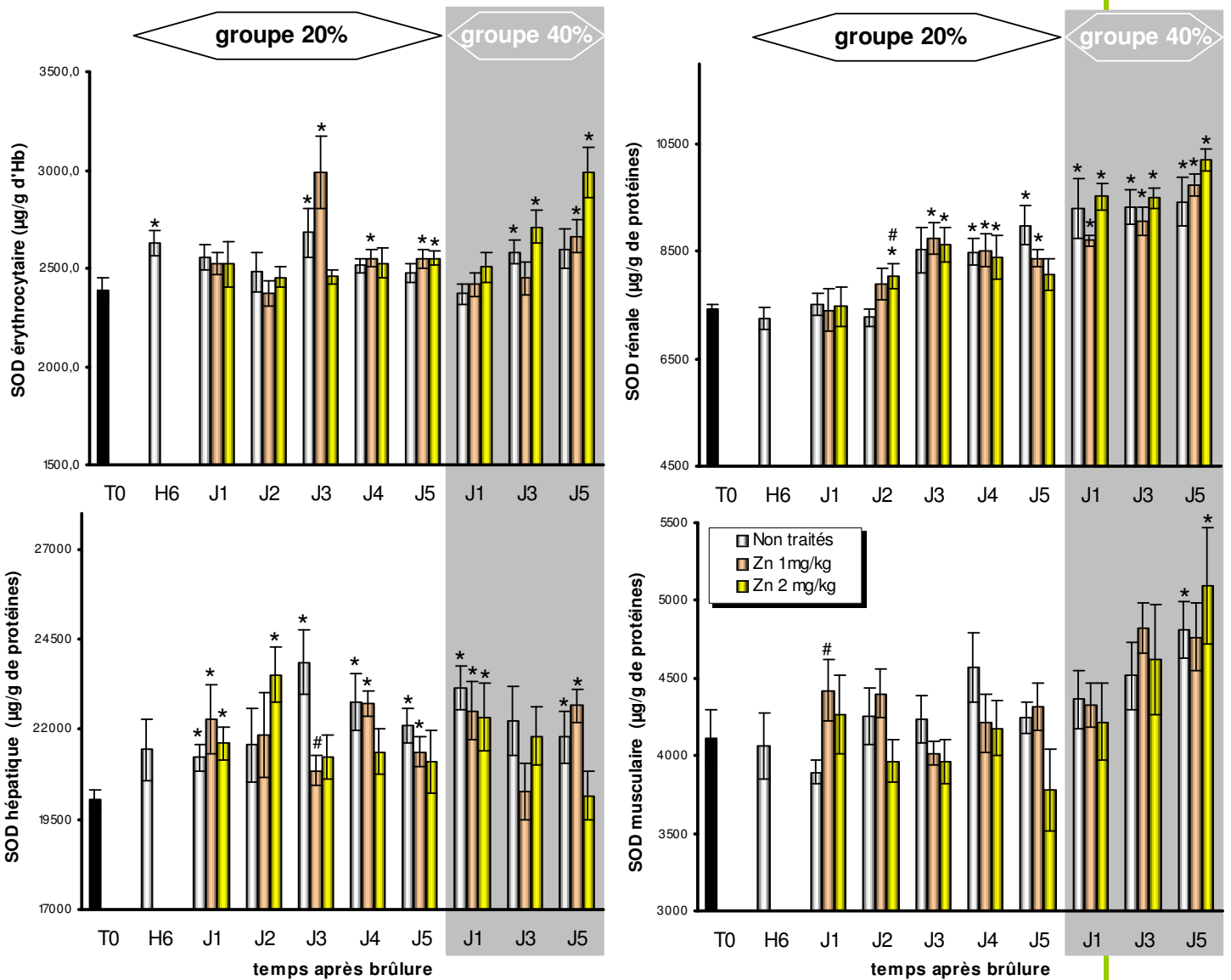
Le statut antioxydant total, les groupements thiols (**Figure 37**) et le glutathion sont significativement déprimés durant les cinq jours après brûlure. Cette chute est d'autant plus importante que la brûlure est étendue. Cette tendance n'est pas contrecarrée par les injections quelle que soit la dose de Zn apportée.



**Figure 37 :** Evolution de la concentration des groupements thiols (SH) plasmatiques, chez les rats traités ou non par des injections de Zn, après brûlure à 20% ou 40%. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM. \*  $p < 0.05$  : comparaison à T0. #  $p < 0.05$  : rats traités versus rats non traités, le même jour.

Au niveau des enzymes antioxydantes SOD et GPx, des évolutions, suite à la brûlure, peuvent être notifiées (Augmentation progressive de la SOD et de la GPx respectivement sanguine et érythrocytaire ; augmentation de la SOD hépatique ; augmentation de la GPx et de la SOD rénales). Cependant, aucun effet « traitement » concret ne peut être établi (**Figure 38** et **Figure 39**).

► Le stress oxydant s'installe précocement chez les animaux brûlés. De manière inattendue et contrairement au sélénium, un apport en Zn, pris isolément, ne réussit pas à limiter le stress oxydant chez les animaux brûlés. De plus, l'activité de la SOD et de la GPx n'est pas modifiée par la supplémentation.



**Figure 38 : Evolution des concentrations en SOD plasmatique et tissulaires, chez les rats traités ou non par des injections de Zn, après brûlure à 20% ou 40%. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM. \*  $p < 0.05$  : comparaison à T0. #  $p < 0.05$  : rats traités versus rats non traités, le même jour.**

## 2.2.4. Conclusions

Cette étude démontre qu'une supplémentation précoce et quotidienne à l'aide de doses pharmacologiques de gluconate de Zn permet de restaurer, après brûlure, les concentrations en Zn plasmatique et érythrocytaire, voire de dépasser les valeurs physiologiques initiales pour le foie, les reins et l'intestin sans induire d'effets toxiques majeurs. Par conséquent, ces résultats suggèrent que les réserves de Zn facilement mobilisables sont accrues. Cependant, les apports répétés en Zn n'ont pas réussi à restaurer les défenses antioxydantes induites par la brûlure et, en particulier, à augmenter l'activité des enzymes antioxydantes. Aussi, en dépit de ses propriétés antioxydantes et des bénéfiques décrits lors des administrations aux patients, le

Zn ne semble pas jouer un rôle clé vis-à-vis de la réponse antioxydante, dans notre modèle expérimental de rat brûlé.

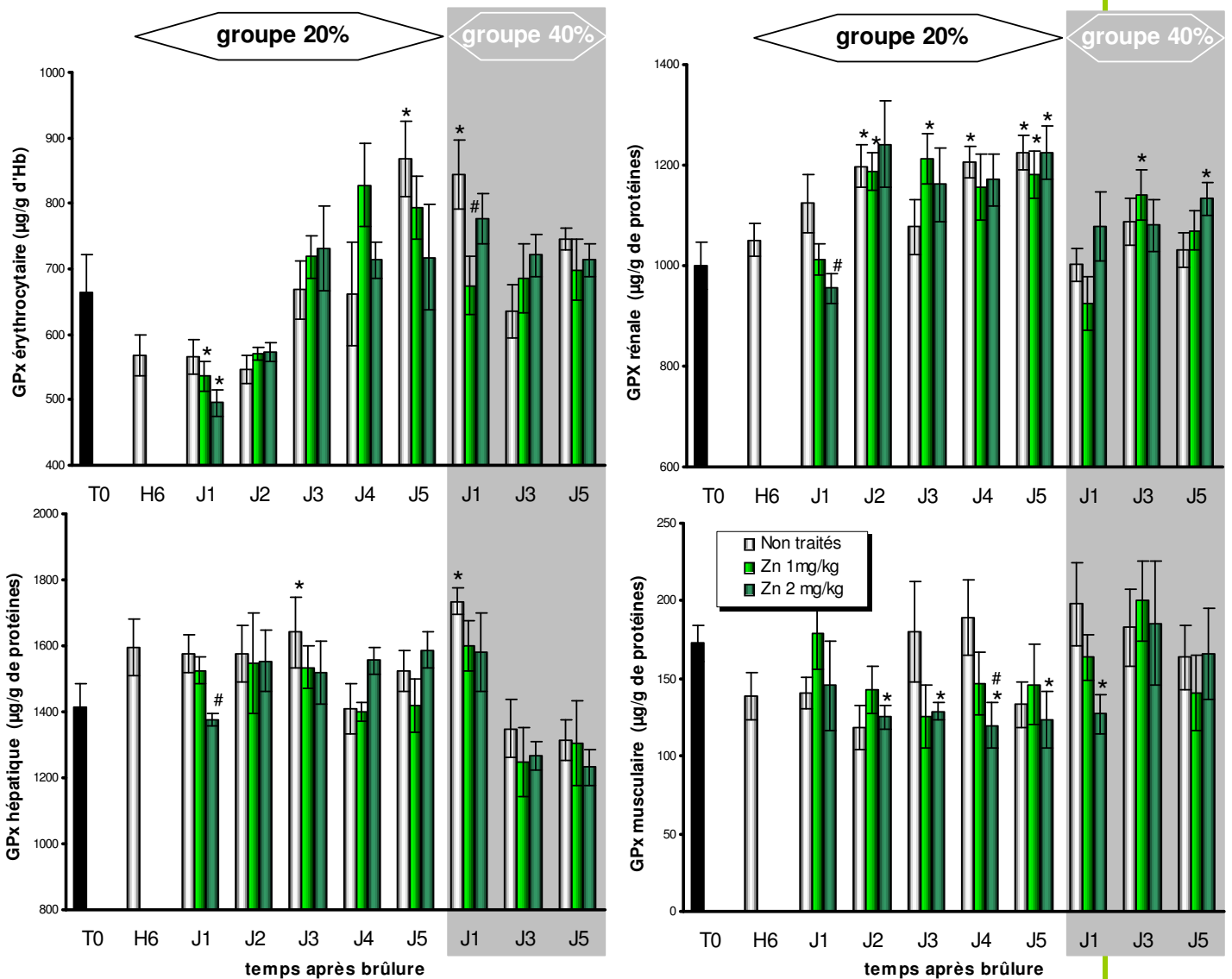


Figure 39 : Evolution des concentrations en GPx plasmatique et tissulaires, chez les rats traités ou non par des injections de Zn, après brûlure à 20% ou 40%. Les résultats sont exprimés en moyenne ± ESM. \*  $p < 0.05$  : comparaison à T0. #  $p < 0.05$  : rats traités versus rats non traités, le même jour.

## 2.2.5. Perspectives

Plusieurs études démontrent les effets bénéfiques d'une supplémentation en Zn, notamment chez les patients brûlés. Ces bénéfices pourraient être dus à des propriétés autres que le pouvoir antioxydant telles que la stimulation de l'immunité et la modulation de la réponse inflammatoire. L'étude des mécanismes de transport du Zn dans les organes, ainsi que les autres voies métaboliques dans lesquelles le Zn est impliqué, nous permettrait de mieux comprendre les mécanismes par lesquels une supplémentation en Zn, après brûlure, s'avère

bénéfique. Dans cette hypothèse, nous avons entrepris, dans la troisième partie de notre travail, une étude des transporteurs du Zn sur notre modèle expérimental de brûlure.

**2.2.6. Article soumis à « Journal of Biological Trace Element in  
Medicine & Biology »**



**Isolated zinc supplementation in burned rats restores zinc status but fails to counteract burn-induced oxidative stress**

Diane Agay<sup>1</sup>, Richard Claeysen<sup>1,2</sup>, Maud Andriollo-Sanchez<sup>1</sup>, Josiane Arnaud<sup>2,3</sup>, Laurence Touvard<sup>1</sup>, Antonia Alonso<sup>1</sup>, Yves Chancerelle<sup>1</sup>, Anne-Marie Roussel<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, 24 Avenue des Maquis du Grésivaudan, BP87, 38702 La Tronche cedex, France.

<sup>2</sup> INSERM U884, Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble cedex 9, France.

<sup>3</sup> Département de Biologie Intégrée, CHU Grenoble, BP 217, 38043 Grenoble Cedex 9, France.

Corresponding author and address for proofs:

Diane Agay

CRSSA

24 Avenue des Maquis du Grésivaudan

BP 87

38702 La Tronche Cedex

France

Telephone number: +33 4 76 63 69 80

Fax number: +33 4 76 63 69 22

E-mail: [diane.agay@crssa.net](mailto:diane.agay@crssa.net)

Short title: Zinc supply improves zinc status but not burn-induced oxidative stress in burned rats.

**Summary**

Trace elements status in burned patients is important to be kept in mind because they could be implicated in immune and antioxidant responses to the injury. In consideration of the antioxidant properties of zinc, the aim of this study was to evaluate in an animal model the benefit of zinc supplementation for fighting the burn-induced oxidative stress.

In this context, in severely burned rats with a previous sub-deficiency of zinc in order to mimic the current status of general population, we evaluated the effects of an important zinc supply on zinc status restoration, on total antioxidant status and on antioxidant enzymes within the first five days following the thermal injury.

The experiment showed that the zinc status and the antioxidant response were as more markedly injured as the burned area was extended. In addition, our study demonstrated that an early and daily supply of high doses of Zn succeeded in restoring impaired Zn status, without inducing toxic effects. But unfortunately, Zn supplementation failed to limit burn-induced oxidant stress, to strengthen the antioxidant status and to improve the activity of antioxidant enzymes.

Also, in spite of the real benefit of its clinical administration to burned patients and its demonstrated antioxidant properties, the zinc appeared not to be the most important trace element acting in antioxidant response to a burn injury. Nevertheless, given the beneficial effects of combined micronutrient supplies in burned patients, further studies are needed to investigate the metabolic pathways really improved by Zn supplementation.

**Keywords**

Burn injury, zinc supplementation, zinc status, antioxidant response, rat model.

### **Introduction**

Trace elements are presenting a growing interest for severely burned patients in relation to their potential involvement in oxidative stress and immune disturbances induced by the injury [1-3]. Clinical studies showed indeed that reinforcing antioxidant defenses by early supplementation improved the recovery of the patients [4]. Nevertheless, the impact of the trace elements supplementation in burned patients remains unclear and the required rates of intakes are still undefined. In this context, the clinicians are waiting for more experiments focusing on the benefice of trace elements supplies after burn.

As zinc (Zn) acts in immunity [5], antioxidant mechanisms [6] and tissue repair [7], zinc intakes should be essential in order to improve the convalescence of burned patients. The Zn supplementation has also been shown as more important as the Zn losses dramatically increased after burn injury [3], as more markedly as a zinc sub-deficient status is frequently observed in general population [8-10].

In this way, we studied the effect of a zinc supplementation in an animal model of severe thermal injury consisting in rats previously depleted in zinc before aggression, in order to mimic the sub-deficient status of the patients. The potential benefit of a zinc supplementation at a very high dose, considered as subtoxic for healthy systems but probably necessary in the context of burned deficient patients, was tested in burned animals, with two different doses of zinc which were demonstrated to be the highest non toxic doses in healthy rats after intraperitoneal administration [11]. In our model, we aimed to evaluate the effects of the zinc supplementation on zinc status restoration, in relation with copper (Cu) levels, on burn-induced oxidative stress and on enzymatic antioxidant defenses within the first five days following the burn injury.



## Materials and Methods

### *Animal care*

The animal experiment was performed in accordance with French ethical guidelines to minimize pain and suffering to the rats and the procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the French Defense Medical Research Centre.

Three weeks old male Wistar rats were purchased from Charles River Laboratories (Saint Germain sur l'Arbresle, France). Animals were housed in thermoformed polystyrene cages, first by four and then individually relating to their body weight, according to the zootechnical standards prescribed by Agriculture and Environment Ministry for laboratory rodents. As early as their weaning, the rats were conditioned with a zinc depleted diet (10 ppm of Zn) purchased from SAFE (Epinay sur Orge, France), as previously described [12]. The water was demineralized to avoid zinc contamination. During the conditioning period, for eight weeks, each animal was handled daily to minimize experimental stressors and weighed every week, in order to follow its growth curve. After experimental injury, the food and the litter were sterilized to limit bacterial contamination risk for the immunodepressed burned animals.

### *Study design*

After the conditioning by the Zn diet, 130 animals were randomly divided among 26 groups of 5 rats. The first group corresponded to non-burned rats used for initial values (T0). The others rats were divided among a first group of 80 rats burned on 20% of their total body surface area (TBSA), untitled "20% group", and a second group of 45 rats burned on 40% of their TBSA, untitled "40% group". Animals were sacrificed six hours (H6), one day (D1), two days (D2), three days (D3), four days (D4) and five days (D5) after thermal injury in 20% group and on D1, D3 and D5 for animals in 40% group.

In burned rats, a zinc treatment or a control treatment was begun as soon as six hours after injury and then injected daily until the sacrifice. In 20% and 40% groups, the rats were also subdivided in three series receiving optionally intraperitoneal injections of physiological saline solution for the “untreated” rats, or intraperitoneal injections of zinc gluconate at  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  or at  $2 \text{ mg.kg}^{-1}$  for the two others “treated” series.

#### ***Experimental thermal injury***

According to procedure defined by Walker and Mason [13], a non lethal third-degree thermal injury involving 20% TBSA or 40% TBSA was applied to the animals as previously described [12,14]. Briefly, under anesthesia, the dorsal skin of the rats was immersed in a boiling water bath at  $100^{\circ}\text{C}$  for 10 sec. As this procedure leads to a full thickness skin burn of third degree, nervous terminations are histologically and functionally destroyed. The skin lesions appear painless and are also well-tolerated by the rats. Therefore, no analgesic was further required for the burned animals.

#### ***Blood and tissue samples***

After an overnight fast of the rats, blood was sampled under halothane anesthesia as precisely described in our preliminary studies [11,12]. Briefly, the blood was collected after laparotomy in trace-element-free syringes by vena cava puncture and specially conditioned for the different dosages: supernatant of whole blood diluted at 1/10 in metaphosphoric acid (MPA 6%) for glutathione measurement, whole blood mixed with RANSEL kit diluting agent (Randox Laboratories, Crumlin, UK) for glutathione peroxidase (GPx) determination, washed centrifuged erythrocytes made up with cold redistilled water for superoxide dismutase (SOD) determination, or heparin plasma for other parameters.

For trace elements status determination in tissues, femur, femoral quadriceps muscle, liver, kidney and intestine were sampled without any preparation. For antioxidant enzyme determination, tissue samples (liver, kidney and muscle) were extracted in lysis buffer as previously described [12]: after a first centrifugation, supernatant was sampled for total proteins determination, and after a second centrifugation for GPx and SOD activity evaluation.

All samples were dispatched in trace elements free microtubes before storage at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

#### ***Biological parameters***

In blood and tissue samples, the biological parameters were determined according to the protocols described in every details in our previous studies [12,14].

#### ***Biochemical assays***

The levels of plasma alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), urea and creatinine (CR) were determined with an automatic analytical instrument (Hitachi 912, Roche Diagnostics, Meylan, France). The sample values were evaluated in comparison with quality controls for normal or pathological standards, Précinorm® U and Précipath® U (Roche Diagnostics).

#### ***Zinc and copper analysis***

Zinc concentrations in acid dilutions of plasma samples and tissue ashes were determined by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) with a Perkin-Elmer 560 model (Norwalk, CT, USA) using previously described methods [15]. Plasma was five fold diluted in hydrochloric acid 0.1M, whereas organs were wet ashed with nitric acid 14M. The ready to use  $1\text{ g.L}^{-1}$  zinc

stock standard solution (Merck, Darmstadt, Germany) was used to prepare calibrants in the range of 1 to 6  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

Plasma copper concentrations were measured by FAAS too [16]: plasma was five fold diluted in 6 % n-butanol and a copper stock solution (Merck, Darmstadt, Germany) was used to prepare calibrants in the range of 1 to 6  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . The femoral, hepatic, muscular, renal and intestinal copper levels were measured by electrothermal atomic absorption spectrometry (EAAS) after previous wet ashing with nitric acid 14M. A copper stock solution was then used to prepare calibrants in the range of 0.4 to 1.6  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  in nitric acid 0.1M.

Seronorm® trace element serum (Sero, Billingstad, Norway) and NIST-SRM 1577b bovine liver powder (National Institute of Standards & Technology, Gaithersburg, MD, USA) were used as internal quality control, respectively for plasma and organs. In the organs, data were expressed as micrograms of Zn or Cu per gram of organ wet weight.

#### *Markers of oxidative status*

The Total Antioxidant Status (TAS) was determined with an automatic analytical instrument (Hitachi 912, Roche Diagnostics, Meylan, France) with a kit purchased from Randox Laboratories (Crumblin, UK).

Protein oxidation was evaluated by plasma sulfhydryl groups (SH) - or thiol groups - determination as described by Faure et al. [17]. The calibration was obtained from a stock solution of 1000  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  N-acetyl cysteine (NAC) in the range of 125 to 600  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Standards and plasma samples were measured by spectrophotometry at 415 nm (Hitachi 912, Roche Diagnostics, France) in the presence of 0.05  $\text{mol.L}^{-1}$  phosphate buffer, 1  $\text{mmol.L}^{-1}$  EDTA, pH 8 and 2.5  $\text{mmol.L}^{-1}$  bis-5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB).

Total and oxidized glutathione (GSH and GSSG) were determined as described by Akerboom and Sies [18]. The reduction of DTNB into 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB) was measured by

spectrophotometry (Uvikon XS, Secomam, France) following absorption at 412 nm. Values were determined comparing the reduction rate against a standard curve of glutathione. Total glutathione levels (GSH) was measured in prepared whole blood samples (above-mentioned preparation) in the presence of  $0.4 \text{ mmol.L}^{-1}$  morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) /  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  EDTA buffer,  $4.8 \text{ mmol.L}^{-1}$  NADPH,  $5 \text{ U.mL}^{-1}$  glutathione reductase,  $3.8 \text{ mol.L}^{-1}$  DTNB.

As far as antioxidant enzymes are concerned, GPx activity was determined according to Paglia and Valentine [19] with a RANSEL kit (Randox Laboratories, Crumlin, UK). Briefly, GPx catalyses the oxidation of GSH by cumene hydroperoxide. In the presence of glutathione reductase and NADPH the oxidized glutathione (GSSG) is immediately converted to the reduced form with a concomitant oxidation of NADPH to  $\text{NADP}^+$ . The decrease in absorbance at 340 nm is measured. In addition, SOD activity was performed in plasma and tissues samples using an adaptation of Woolliams et al. and Arthur et al. [20,21]. This method employs xanthine and xanthine oxidase to generate superoxide radicals which react with 2-(4iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (INT) to form a red formazan dye. The superoxide dismutase activity is then measured by the degree of inhibition of this reaction. One unit of SOD is that which causes a 50 % inhibition of the rate of reduction of INT under conditions of the assay.

#### *Statistical analysis*

All results are expressed as means  $\pm$  SD. The global course of each parameter was evaluated by Kruskal and Wallis rank test and then the comparisons between controls and burned groups or between untreated and zinc supplemented groups were performed with non-parametric rank sum tests (Mann and Whitney tests) using Statistica 7.1 software (StatSoft,

France). Differences were considered statistically significant when  $p$  values were less than 0.05.

## Results

### *Effect of zinc supplementation on blood biochemical parameters*

The values of biochemical parameters are presented in Table 1. ALT level increased as soon as the first hours after injury to reach a maximal value one day after, more markedly in 40% group than in 20% group. ALT decreased then progressively but remained up to initial value until D5. After three (20% group) or five days (40% group), the intraperitoneal administration of Zn allowed a more rapid decrease of ALT levels.

AST level increased more quickly in the blood of the burned animals with a maximal peak three hours after injury (data not shown). AST remained then significantly elevated and it normalized progressively within five days. Unfortunately, Zn administration led to the worsening of AST release in blood of 40% TBSA burned rats at D1. CK levels showed an evolution quite comparable to AST. After a precocious peak three hours after burn, CK level decreased a little more quickly to reach normal values as soon as D1 in 20% group, without any noteworthy variation after. In the same way as for AST, Zn administration induced a significant increase of CK release after three days in 20% group, and this effect was noticed more markedly and more quickly in 40% group. The evolution of LDH agreed with this tendency and we observed a significant release of LDH in blood from 30 minutes to three hours after the burn (data not shown) and an aggravation of its release after Zn treatments at D3, whatever the burned surface area was.

As far as renal parameters are concerned, after a maximal release of urea six hours after 20% TBSA burn injury, its level normalized one day after and then increased significantly but

more moderately from D2 to D5. In 40% group, the precocious peak was more important and the increased level was still noticed at D1. The CR course was comparable with a transient significant peak 6 hours after injury as marked as the burned skin area increased. The Zn intraperitoneal injections have not induced any change in urea and CR levels.

#### *Effect of zinc supplementation on zinc status after burn*

As far as circulating zinc is concerned, the skin burn induced an early decrease of plasma Zn levels in animals, significant as soon as 6 hours after injury (Figure 1). One day after, this effect is all the more marked as the burn area is wider, as underlined by the comparison between untreated rats burned on 20% or 40% of their TBSA. Without any Zn administration, the plasma Zn level remained significantly reduced during five days after thermal injury. The course of Zn level in red blood cells (RBC) is similar except for 40% TBSA burned rats in which it was surprisingly not modified (data not shown). Repeated injections of Zn gluconate at  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  have restored plasma Zn levels within two days in 20% group, or three days in 40% group, as the restoration of Zn level in RBC was slightly delayed. With Zn injections at  $2 \text{ mg.kg}^{-1}$ , the Zn levels increased more quickly, went beyond initial value within one or two days, and even overran initial value after a few days, as Zn plasma level at D3 in 40% TBSA burned rats for example.

Contrary to what is observed in blood compartment, the Zn level increased in liver after burn injury all the more as the burn area increased as shown by the comparison between 20% and 40% TBSA burned rats (Figure 1). The treatments enhanced this evolution with significant increases of Zn levels observed a few days after burn, at  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  or more markedly at  $2 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Values have also achieved a twofold increase with the higher dose of Zn supplementation. Hepatic Zn levels in all 40% groups were again amplified compared to 20% groups.

In other deep organs, as femur, muscle, kidney and intestine, the Zn levels remained relatively stable after burn (Figure 1). In kidney and in intestine, Zn levels were not modified by burn and, as in liver, the supplementation at  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  of Zn gluconate led to an increase of Zn levels, limited to D3 and D4 in 20% groups. The supplementation at  $2 \text{ mg.kg}^{-1}$  made an additional increased of Zn levels. The 40% TBSA burn animals were characterized by an amplification of the response of kidney and intestine to the treatments. In femur and in muscle, the Zn treatments have not induced any frank modifications (data not shown).

#### ***Effect of zinc supplementation on copper status after burn***

Concerning the copper status, the burn induced a transient decrease of Cu plasma level 6 hours after injury in 20% group, more marked until D1 when the burn area enlarged to 40%, which was followed by a significant important increase during five days (Table 2). Daily administration of Zn led to slightly minimize this increase at D5. In RBC, after a peak at H6, the Cu level decreased a little but remained higher than the initial value during the five days after burn in 20% group, and it was not modified by treatments (data not shown). In 40% TBSA burned animals, the Cu level remained two-fold increased after burn from H6 to D5 and the supplementation at 1 or  $2 \text{ mg.kg}^{-1}$  led to a decrease to values respectively comparable or inferior to those of 20% TBSA burn animals. In liver, burn has led to an increase of Cu level which was corrected by treatments at D5 only in 40% animals. In kidney, Cu level was not modified in 20% group contrary to 40% group in which this level fell as soon as the day after burn, without any modifications by treatments. In intestine, the Cu levels did not vary after burn, but treatments led to significant increases within 4 or 3 days in respectively 20% or 40% TBSA burn animals. In femur and muscle, Cu level was not modified by burn or treatments (data not shown).



*Effect of zinc supplementation on antioxidant status*

The total antioxidant status (TAS) appeared significantly depressed during the five days after burn injury and its decrease was all more important as the burn area increased (Figure 2). Whatever the dose of Zn treatment, the Zn administration failed in counteracting this tendency within five days. In the same time, the thiol groups followed the same kinetic as TAS after thermal injury, with a significant decrease proportional to the burned area, and their levels did not vary with Zn administration (Table 3). Total glutathione was also lowered all along the experiment with no effect of treatments (Table 3).

Antioxidant enzyme activity varied in the different compartments. In RBC, GPx showed a progressive increase within the five first days after burn without any effect of treatments (Table 4) and SOD appeared slightly increased after D3, particularly in treated animals (Table 5). In the liver, GPx activity was not disrupted during the same period, even if isolated high values were noticed, whereas SOD activity appeared significantly enhanced from D1 to D5. In the kidney, the activity of antioxidant enzymes was still more increased than in liver. Renal GPx levels appeared significantly superior to initial values from D2 to D5 and SOD activity increased from D3 to D5 in 20% group, and more markedly from D1 to D5 in 40% group. In opposite, muscular SOD activity remained stable during the observation period, with a significant increased just in 40% after five days, and the injections at  $2 \text{ mg.kg}^{-1}$  have even led to a significant decrease of GPx activity from D2 to D5 in muscle of 20% TBSA burned animals.

**Discussion**

Previous investigations in French burned patients' recovery centers have shown that clinical protocols for trace elements supply are not standardized and many differences between the care units are noticed in relation with galenic forms, dosages or administration frequency of

prescribed trace elements [22]. For instance, concerning Zn, a factor 35 was found in administered doses between the least and the most supplemented protocols. According to the present knowledge, the resuscitation practitioners in charge of critically burned patients consider that most of the commercial preparations for trace elements supply actually available are inadequate to cover the increased needs in zinc, selenium and copper of critically of their patients, and in addition iterative administration of these commercial products could be dangerous by inducing an overload of other compounds as manganese, chromium or iron. Moreover, these increased requirements of trace elements are particularly important to be taken in mind in Europe where the trace elements status of the patients appears sub-deficient before their admission in intensive care unit (ICU), because of low diet intakes in general population [8,10]. But data concerning trace elements requirements in burned patients are scarce and the practitioners are waiting for more experimental studies designed to precise the adequate levels for supplying high doses of trace elements in relation with their therapeutic effects and the absence of acute toxicity in such depleted patients.

In that way, we developed an experimental model of severe burn injury in Zn sub-deficient rats [12], even if the role of zinc status on metabolism was often examined in animals with severe Zn deficiency, with typically 0-2 ppm of zinc in diet [23-26]. We preferred induce a mild zinc deficiency (10 ppm in diet) that better corresponds to the sub-deficient status observed in general population and therefore in burned patients at their hospitalization in ICU. In opposite to Zn severely depleted rats which presented weight loss, skin lesions, diarrhea, healing impairments or dysfunctions of gene expression or of immune response [27,28], the depleted diet was well-tolerated by all animals, without any major clinical side effect in Zn sub-deficient rats : weight loss was controlled, depilation was very moderate and absence of inflammation and copper metabolism perturbation due to Zn/Cu interaction was checked by

stable levels of this trace element [12]. Consequently, we could assume that, in our animal experimental model, the modifications observed after burn for oxidative stress parameters and for Zn status were not disrupted by any inflammation status, growth impairment or poor caloric intake imputed to sub-deficient diet prior to injury. Also this model allowed us to study the effects of the spread of the burn area on the importance of biological consequences of the injury and to test the benefit of intraperitoneal administration of high doses of Zn to minor them.

The comparison of the course of the parameters collected in untreated rats of 20% and 40% groups underlined the influence of the severity of the burn injury on the importance of impaired functions. The experiments showed that the severity of the metabolic burn-induced lesions increased with the spread of the wound. As a matter of fact, the biochemical disorders underlined by ALT, AST, urea or CR perturbations, the modifications of Zn levels measured in circulation or in liver, and the depression of antioxidant defenses with the decrease of TAS, thiol groups and glutathione are more important in 40% than in 20%TBSA burned rats.

Before designing this study, the optimal high-dose of zinc therapeutically dispensable to healthy rats by intraperitoneal recurrent administrations, without toxic effects on organ function, was previously determined in a preliminary experiment [11]. As underlined by others, the therapeutic treatment of adult rats with repeated intraperitoneal zinc injections at  $4 \text{ mg.kg}^{-1}$  should be avoided, due to clinical adverse effects within a few days, such as intraperitoneal local intolerance or major growth underdevelopment [29]. According to our results, no serious adverse effect was observed within one week on rats injected intraperitoneally with 1 or  $2 \text{ mg.kg}^{-1}$  per day of zinc gluconate, which tends to indicate that

those doses could be used for future therapeutic research on required Zn supplementation levels in severely burned rats.

The first step for our study was to check whether the chosen doses for Zn supply were toxic for the severely burned rats. First, we did not observe any clinical sign in relation to acute Zn toxicity such as tachycardia or digestive disorders [30]. At the end of the clinical observation periods, no cardiac, peritoneal, renal or hepatic lesions were also noticed during the autopsy of the Zn treated rats. In addition, biochemical parameters did not let out any major problem after Zn supply in relation to vital functions. Indeed similar kinetics were observed for ALT, urea and CR levels in untreated and Zn supplemented rats during the five days after burn, showing the absence of acute hepatic and renal toxicity of the high doses of Zn administered in injured rats. Nevertheless, several transient significant differences observed for AST, CK or LDH levels between untreated and supplemented rats underlined a tissular pain in relation to Zn treatment, particularly in muscles. But they have to be put in perspective with caution because such differences only appeared moderated, scarce and punctual, as they always normalized within one day. Taken these results in consideration, the high doses of 1 and 2 mg.kg<sup>-1</sup> per day of zinc gluconate were well tolerated by burn injured rats, which Zn requirements were increased in comparison with healthy animals.

In the post-trauma period, the plasma proteins binding trace elements are broken down by increased tissue catabolism and a large redistribution of trace elements take place towards vital organs [31]. The supplementation of burned rats with Zn gluconate was performed in order to normalize as soon as possible this redistribution. Even if the study performed during five days was not long enough to allowed modifications of the Zn level in bone compartment, where exchanges are slower than in other organs, the Zn supplementation of burned rats at

doses of 1 or 2 mg.kg<sup>-1</sup> per day has clearly induced, both in plasma and other tissues, major modifications of Zn status. Hence we have indirect evidences of retention of Zn supplied even if, during Zn supplementations, large amounts are excreted in faeces and, in a minor way, in urines [11,32]. Zn supplementation led indeed to an increase of Zn tissue levels which appeared more and less desirable in function of previously burn-induced variations and three different patterns could be distinguished. First, in plasma and RBC, the rapid increase of Zn levels after Zn supplementation could be considered as a beneficial effect because it compensated the Zn depression observed after burn, as markedly as the administrated dose of Zn was important, in accordance with supplementation results published in clinical studies [3]. Secondly, in intestine and kidney, no modifications of Zn levels were noticed after burn and, even if no readjustment was necessary, the increase of Zn levels due to the Zn supplementation appeared not deleterious with regard to the absence of specific biochemical markers of tissue suffering. Thirdly, in liver where an increase of Zn level is still noticed after injury proportionally to burn spread, the elevation of Zn levels after supplementation intensified this variation, as more intensively as the injected dose of Zn increased. This effect could be deleterious for injured organism, but in our model, the absence of ALT release in circulation after the beginning of the Zn treatment and even the benefit of Zn supplementation for accelerating the recovery of normal ALT levels after its burn-induced increase invalidated this hypothesis. In the same time, the redistribution of copper between these different compartments confirmed that Zn supplementation was beneficial for burned rats by accelerating the restoration of injured trace elements status. In this way, the Zn supplementation limited, after a few days, the increase of plasma, RBC and liver Cu levels induced in rats by the burn, more markedly after the daily administration of Zn at 2 mg.kg<sup>-1</sup> than at 1 mg.kg<sup>-1</sup>. Moreover, the stability of Zn levels in muscle of untreated and supplemented rats after burn, in spite of the muscular damages underlined by the increase of

circulating CK and AST levels, let us think that Zn status was not determining for the metabolism of this organ. Be that as it may, the supplementation with high doses of Zn gluconate led within a few days to the improvement of easily available Zn reserves in burned rats.

As clinical interventional studies had demonstrated in burn patients the beneficial effects of important zinc supply for improving wound healing and shortening the length of hospital stays [4], further investigations were needed to evaluate the metabolic pathways precisely improved by Zn treatments. According to the different biological properties of zinc, alternatively presented as an antioxidant [33], as a regulatory factor for insulin metabolism [34] and therefore as an anti-infection micronutrient [27], the aim of this study was to evaluate whether or not the antioxidant properties of Zn played a key role for improving the burned patients healing after therapeutic supplementations with large doses of this trace element. Indeed, antioxidant properties of Zn have been well-documented and different molecular mechanisms may occur [35,36]. First, Zn inhibits the NADPH oxidase which catalyzes the production of  $O_2^{\bullet-}$ . It also has structural functions in Cu/Zn SOD, a major antioxidant enzyme. In addition, Zn is known to induce the production of metallothioneins which are excellent scavengers of  $HO^{\bullet}$  because of their richness in cysteine. And finally Zn is known to compete with both iron and copper in Fenton reactions. In our experiment, an oxidative stress takes place very early after burn, as demonstrated by the rapid collapse of TAS. Even if the relevance of this biological marker is still discussed nowadays, some authors deploring its low pertinence for burn studies [37] even though others use it with benefit [38], this antioxidant consumption was confirmed by the decrease of thiol groups and glutathione in blood, as soon as D1. Unexpectedly and contrary to selenium, which early massive supply succeeded in improving antioxidant status of severely burned rats [39], high Zn intakes, as

isolated treatment, failed to counteract the increase of oxidative stress observed in Zn sub-deficient rats after burn, whatever the dose injected was, even if the Zn status was really improved. In addition, the activity of antioxidant enzymes as SOD and GPx were also not modified by daily Zn injections. In previous studies, we demonstrated an increase of SOD in reaction to the decrease of GPx in selenium deficient rats [40]. Here, probably related to the stability of GPx, no modification in SOD activity was observed. Moreover, because in Cu/Zn SOD the zinc atoms have only a structural function, zinc supplementation could not increase Cu/Zn SOD activity. In opposition to other studies performed in different models, non-burned rats or diabetics rabbits, in which Zn supplementation improves antioxidant systems [6,41], we can postulate that, in our burn injury model, metabolism pathways differ and that a supplementation with high doses of Zn, alone, could not counteract early oxidative disorders.

In conclusion, this experiment presented a relevant animal model to study the impact of burn injury on major metabolic functions. After a severe burn, the zinc status and the antioxidant response of the body appeared particularly injured, and these effects were as more important as the burned area was extended. In this context, in consideration of antioxidant properties of zinc, the early correction of impaired status of zinc was considered as a potential way for fighting burn-induced oxidative stress. Our study demonstrated that an early and daily supply of high doses of Zn gluconate, after burn, succeeded in restoring Zn plasma and RBC levels at initial values and improved Zn liver, kidney and intestine levels over the baseline, without inducing major toxic effects. In addition, Zn supplementation failed unfortunately to limit burn-induced oxidant stress, to strengthen the antioxidant status and to improve the activity of antioxidant enzymes. Also, in spite of it the real benefit of its clinical administration to burned patients and its demonstrated antioxidant properties, the zinc appeared not to be the most

important trace element acting in antioxidant response to a burn injury. Nevertheless, given the beneficial effects of combined micronutrient supplements in burned patients, further studies are needed to investigate the real effects of Zn supplementation on impaired metabolism. The study of the cellular mechanisms of Zn transportation in organs and of the other metabolic pathways in which Zn is implicated will allowed us to better understand the undeniable benefit of its high supplies after burn.

#### **Acknowledgements**

We thank H.Chaussard, D.Coulon, A.Zocaro and J.Denis (CRSSA, Grenoble) for their excellent technical assistance.

This work was supported by a grant from Délégation Générale à l'Armement (DGA, France).

#### **Conflict of interest statement**

The authors have no financial or proprietary interest in the subject matter.



**References**

- [1] Selmanpakoglu AN, Cetin C, Sayal A, Isimer A. Trace element (Al, Se, Zn, Cu) levels in serum, urine and tissues of burn patients. *Burns* 1994;20(2):99-103.
- [2] Voruganti VS, Klein GL, Lu HX, Thomas S, Freeland-Graves JH, Herndon DN. Impaired zinc and copper status in children with burn injuries: need to reassess nutritional requirements. *Burns* 2005;31(6):711-716.
- [3] Berger MM, Baines M, Raffoul W, Benathan M, Chioloro RL, Reeves C, Revely JP, Cayeux MC, Senechaud I, Shenkin A. Trace element supplementation after major burns modulates antioxidant status and clinical course by way of increased tissue trace element concentrations. *Am J Clin Nutr* 2007;85(5):1293-1300.
- [4] Berger MM, Shenkin A. Trace elements in trauma and burns. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998;1(6):513-517.
- [5] Hirano T, Murakami M, Fukada T, Nishida K, Yamasaki S, Suzuki T. Roles of Zinc and Zinc Signaling in Immunity: Zinc as an Intracellular Signaling Molecule. *Adv Immunol* 2008;97C:149-176.
- [6] Jing MY, Sun JY, Zi NT, Sun W, Qian LC, Weng XY. Effects of zinc on hepatic antioxidant systems and the mRNA expression levels assayed by cDNA microarrays in rats. *Ann Nutr Metab* 2007;51(4):345-351.
- [7] Casey G. Nutritional support in wound healing. *Nurs Stand* 2003;17(23):55-58.
- [8] Prasad AS. Zinc deficiency in women, infants and children. *J Am Coll Nutr* 1996;15(2):113-120.
- [9] King JC, Shames DM, Woodhouse LR. Zinc homeostasis in humans. *J Nutr* 2000;130(5S Suppl):1360S-1366S.
- [10] Pennington JA. Intakes of minerals from diets and foods: is there a need for concern? *J Nutr* 1996;126(9 Suppl):2304S-2308S.

- [11] Andriollo-Sanchez M, Claeysen R, Arnaud J, Touvard L, Denis J, Chancerelle Y, Roussel AM, Agay D. Toxic effects of iterative intraperitoneal administration of zinc gluconate in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;103(3):267-272.
- [12] Claeysen R, Andriollo-Sanchez M, Arnaud J, Touvard L, Alonso A, Chancerelle Y, Roussel AM, Agay D. Burn-induced oxidative stress is altered by a low zinc status: kinetic study in burned rats fed a low zinc diet. *Biol Trace Elem Res* 2008;126 Suppl 1:S80-96.
- [13] Walker HL, Mason AD, Jr. A standard animal burn. *J Trauma* 1968;8(6):1049-1051.
- [14] Claeysen R, Andriollo-Sanchez M, Arnaud J, Touvard L, Alonso A, Chancerelle Y, Roussel AM, Agay D. Effect of sub-deficient zinc status on insulin sensitivity after burn injury in rats. *Biol Trace Elem Res* 2009;127(2):132-142.
- [15] Arnaud J, Bellanger J, Bienvenu F, Chappuis P, Favier A. Recommended method for assaying serum zinc with flame atomic absorption. *Ann Biol Clin* 1986;44(1):77-87.
- [16] Arnaud J, Bellanger J, Chappuis P, Favier A, Galliot M. Recommendations for the assay of serum copper by flame atomic absorption spectrometry. *Ann Biol Clin* 1985;43:297-318.
- [17] Faure P, Lafond JL. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: Favier AE, Cadet J, Kalnayanaraman M, Fontecave M, Pierre JL, editors. *Analysis of free radicals in biological systems*. Birkäuser, Basel, Boston, Berlin; 1995. p 237-248.
- [18] Akerboom TP, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 1981;77:373-382.
- [19] Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70(1):158-169.

- [20] Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Res Vet Sci* 1983;34(3):253-256.
- [21] Arthur JR, Boyne R. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. *Life Sci* 1985;36(16):1569-1575.
- [22] Agay D, Spadoni S, Almeras D, Galois-Guibal L, Touvard L, Chancerelle Y. Enquête relative à la supplémentation en vitamines et en éléments traces dans les centres de traitements des brûlés. *Brûlures* 2007;VIII(3):127-133.
- [23] Eberle J, Schmidmayer S, Erben RG, Stangassinger M, Roth HP. Skeletal effects of zinc deficiency in growing rats. *J Trace Elem Med Biol* 1999;13(1-2):21-26.
- [24] Hosea HJ, Taylor CG, Wood T, Mollard R, Weiler HA. Zinc-deficient rats have more limited bone recovery during repletion than diet-restricted rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004;229(4):303-311.
- [25] Bruno RS, Song Y, Leonard SW, Mustacich DJ, Taylor AW, Traber MG, Ho E. Dietary zinc restriction in rats alters antioxidant status and increases plasma F2 isoprostanes. *J Nutr Biochem* 2007;18(8):509-518.
- [26] Oteiza PI, Olin KL, Fraga CG, Keen CL. Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes. *J Nutr* 1995;125(4):823-829.
- [27] Cuevas LE, Koyanagi A. Zinc and infection: a review. *Ann Trop Paediatr* 2005;25(3):149-160.
- [28] Prasad AS. Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Exp Gerontol* 2008;43(5):370-377.
- [29] Piao F, Yokoyama K, Ma N, Yamauchi T. Subacute toxic effects of zinc on various tissues and organs of rats. *Toxicol Lett* 2003;145(1):28-35.

- [30] Maret W, Sandstead HH. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J Trace Elem Med Biol* 2006;20(1):3-18.
- [31] Agay D, Anderson RA, Sandre C, Bryden NA, Alonso A, Roussel AM, Chancerelle Y. Alterations of antioxidant trace elements (Zn, Se, Cu) and related metallo-enzymes in plasma and tissues following burn injury in rats. *Burns* 2005;31(3):366-371.
- [32] Dong YL, Zhu ZM, Li J. [Copper and zinc content of the serum of burned patients]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 1988;26(1):34-36, 61-32.
- [33] Zago MP, Oteiza PI. The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2001;31(2):266-274.
- [34] Haase H, Maret W. Fluctuations of cellular, available zinc modulate insulin signaling via inhibition of protein tyrosine phosphatases. *J Trace Elem Med Biol* 2005;19(1):37-42.
- [35] Powell SR. The antioxidant properties of zinc. *J Nutr* 2000;130(5S Suppl):1447S-1454S.
- [36] Prasad AS, Bao B, Beck FW, Kucuk O, Sarkar FH. Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radic Biol Med* 2004;37(8):1182-1190.
- [37] Farriol M, Fuentes F, Venereo Y, Solano I, Orta X, Segovia T. Antioxidant capacity in severely burned patients. *Pathol Biol (Paris)* 2001;49(3):227-231.
- [38] Frisman E, Drozda D, Sipulova A, Racz O, Babik J. Total antioxidant capacity of serum and prognostic indices in patients with burn trauma. *Acta Chir Plast* 2004;46(1):19-22.
- [39] Agay D, Sandre C, Ducros V, Faure H, Cruz C, Alonso A, Roussel AM, Chancerelle Y. Optimization of selenium status by a single intraperitoneal injection of Se in Se-deficient rat: possible application to burned patient treatment. *Free Radic Biol Med* 2005;39(6):762-768.

- [40] Sandre C, Agay D, Ducros V, Faure H, Cruz C, Alonso A, Chancerelle Y, Roussel AM. Kinetic changes of oxidative stress and selenium status in plasma and tissues following burn injury in selenium-deficient and selenium-supplemented rats. *J Trauma* 2006;60(3):627-634.
- [41] Duzguner V, Kaya S. Effect of zinc on the lipid peroxidation and the antioxidant defense systems of the alloxan-induced diabetic rabbits. *Free Radic Biol Med* 2007;42(10):1481-1486.

**Legends for illustrations**

**Figure 1.** Evolution of zinc levels in plasma and organs of untreated and Zn supplemented rats after a 20% or 40% TBSA burn.

**Figure 2.** Evolution of Total Antioxidant Status in untreated and Zn supplemented rats after a 20% or 40% TBSA burn.

**Table 1.** Evolution of blood biochemical parameters in untreated and Zn supplemented rats after a 20% or 40% TBSA burn.

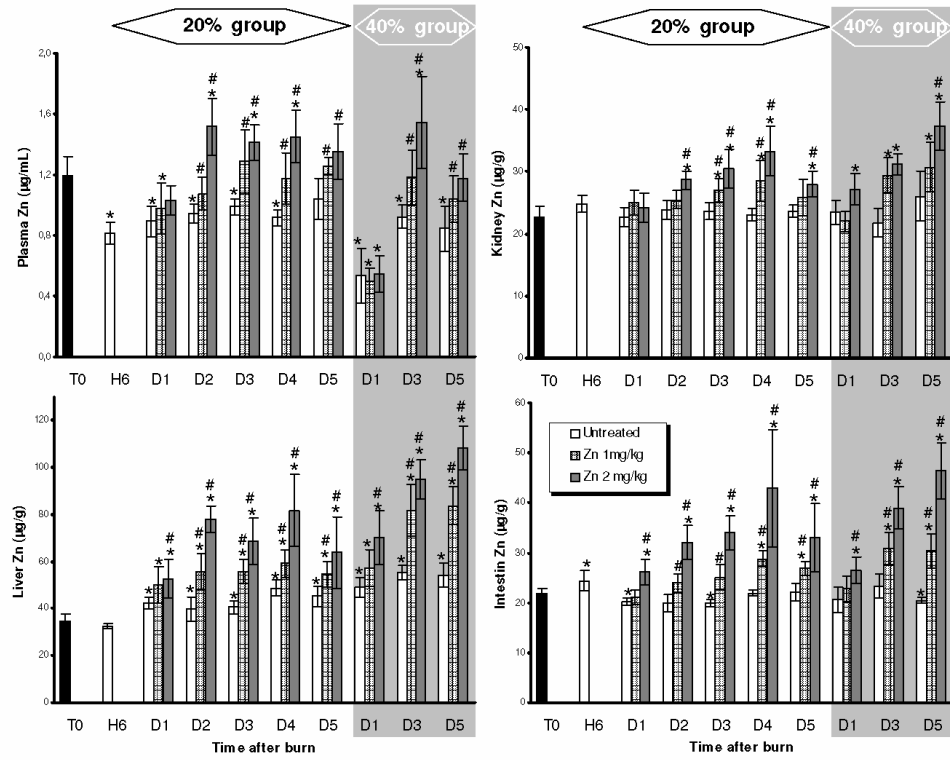
**Table 2.** Evolution of copper levels in plasma and organs of untreated and Zn supplemented rats after a 20% or 40% TBSA burn.

**Table 3.** Evolution of total glutathione (GSH) and thiol groups (SH) in untreated and Zn supplemented rats after a 20% or 40% TBSA.

**Table 4.** Evolution of GPx levels in blood and organs of untreated and Zn supplemented rats after a 20% or 40% TBSA burn.

**Table 5.** Evolution SOD levels in RBC and organs of untreated and Zn supplemented rats after a 20% or 40% TBSA burn.

**Figure 1.** Evolution of zinc levels in plasma and organs of untreated and Zn supplemented rats after a 20% or 40% TBSA burn.

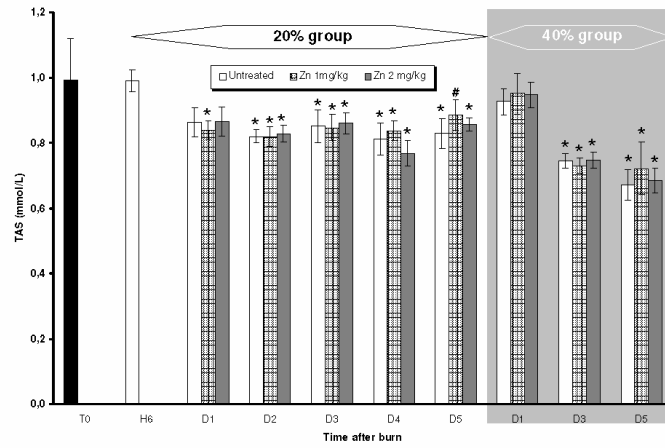


Data are presented as means  $\pm$  SD (n=5) and are expressed, in organs, on a wet weight basis.

\*  $p < 0.05$  : comparison to the initial values (T0).

#  $p < 0.05$  : comparison of Zn treated series to untreated series, on the same day.

**Figure 2.** Evolution of Total Antioxidant Status in untreated and Zn supplemented rats after a 20% or 40% TBSA burn.



Data are presented as means  $\pm$  SD (n=5).

\*  $p < 0.05$  : comparison to the initial values (T0).

#  $p < 0.05$  : comparison of Zn treated series to untreated series, on the same day.



**Table 1.** Evolution of blood biochemical parameters in untreated and Zn supplemented rats after a 20% or 40% TBSA burn.

Zn gluconate		T0	20 % group					40 % group			
			H6	D1	D2	D3	D4	D5	D1	D3	D5
<b>ALT</b> (U.L <sup>-1</sup> )	Untreated	22.2 ± 4.2	38.6 * ± 6.6	59.4* ± 11.1	55.8* ± 8.2	44.2* ± 3.0	34.4 * ± 8.7	30.6* ± 7.4	69.4* ± 7.1	43.6 * ± 6.5	22.0 ± 2.3
	1 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	50.4* ± 10.7	62.0* ± 21.0	33.4*# ± 4.2	28.4 ± 7.0	31.0* ± 4.2	74.2* ± 12.7*	47.2* ± 25.0	19.0 ± 3.5
	2 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	66.0 * ± 12.5	39.2*# ± 11.0	28.4*# ± 5.0	24.2 ± 7.3	26.0 ± 5.1	75.8* ± 5.3	35.2* ± 7.3	17.2*# ± 3.3
<b>AST</b> (U.L <sup>-1</sup> )	Untreated	61.1 ± 6.5	156* ± 25.5	167.0* ± 29.3	147.4* ± 39.9	82.6* ± 4.3	83.8* ± 28.4	60.2 ± 8.6	164.2* ± 22.3	122.2* ± 37.2	66.6 ± 21.1
	1 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	155.6* ± 16.9	154.6* ± 74.2	98.6* ± 18.5	78.6* ± 8.5	71.8 *# ± 7.0	217.0 * # ± 35.4	127.6* ± 77.4	58.4 ± 4.3
	2 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	195* ± 35.4	132.0* ± 40.3	92.6* ± 18.6	73.2* ± 8.0	68.0 ± 4.3	221.4*# ± 38.4	92.0* ± 16.7	57.0 ± 7.0
<b>CK</b> (U.L <sup>-1</sup> )	Untreated	337 ± 98	1148* ± 244	308 ± 75	370 ± 80	402 ± 95	410 ± 310	313 ± 125	328 ± 95	146* ± 22	224 ± 187
	1 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	424 ± 149	331 ± 123	559*# ± 115	466 ± 127	396 ± 107	540 ± 314	201*# ± 46	225* ± 58
	2 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	446 ± 197	436 ± 82	593*# ± 213	410 ± 44	431 ± 150	603*# ± 198	274# ± 83	227* ± 54
<b>LDH</b> (U.L <sup>-1</sup> )	Untreated	448 ± 138	624 ± 212	458 ± 122	679* ± 190	642 ± 220	646 ± 573	476 ± 236	441 ± 206	206* ± 59	304 ± 216
	1 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	714* ± 209	476 ± 208	1315*# ± 961	687 ± 225	582 ± 204	476 ± 205	278* ± 59	318 ± 55
	2 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	746 ± 415	613* ± 92	1078* ± 586	626 * ± 103	630 ± 247	584 ± 153	403# ± 215	323 ± 98
<b>Urea</b> (mmol/L)	Untreated	5.0 ± 1.0	13.1* ± 0.9	5.3 ± 0.8	6.8* ± 0.8	8.0* ± 0.8	8.1* ± 0.7	8.7 * ± 0.4	14.6* ± 3.5	7.9* ± 1.2	8.6* ± 1.0
	1 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	4.9 ± 0.7	6.6* ± 0.4	7.8* ± 0.3	8.0* ± 0.6	8.4* ± 1.1	15.3* ± 3.6	7.7* ± 1.4	8.5* ± 1.6
	2 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	5.2 ± 0.7	7.6* ± 1.6	8.2* ± 0.6	8.5* ± 1.0	8.3* ± 1.2	16.8* ± 2.8	8.5* ± 2.2	8.5* ± 0.6
<b>CR</b> (µmol/L)	Untreated	30.8 ± 7.9	47* ± 3.7	29.6 ± 5.9	28.0 ± 2.4	24.0 ± 4.6	27.4 ± 3.8	26.6 ± 3.9	46.4* ± 7.0	25.2 ± 2.8	25.2 ± 3.4
	1 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	30.0 ± 5.3	27.6 ± 1.7	25.0 ± 2.3	28.0 ± 3.1	25.8 ± 3.9	45.2 * ± 6.8	30.0 ± 6.5	29.0 ± 5.2
	2 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	33.0 ± 4.3	32.4 ± 3.7	28.6 ± 3.4	23.8 ± 1.3	27.2 ± 4.1	46.6* ± 2.4	28.8 ± 3.9	25.6 ± 2.5

Data are presented as means (n = 5) ± SD.

\* p < 0.05 : comparison to initial values (T0).

# p < 0.05 : comparison of Zn treated series to untreated series, on the same day.

**Table 2.** Evolution of copper levels in plasma and organs of untreated and Zn supplemented rats after a 20% or 40% TBSA burn.

Zn gluconate	T0	20 % group						40 % group			
		H6	D1	D2	D3	D4	D5	D1	D3	D5	
<b>Plasma</b> ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Untreated	1.14 $\pm 0.11$	0.93* $\pm 0.03$	1.32* $\pm 0.16$	1.57* $\pm 0.11^*$	1.55* $\pm 0.04$	1.59* $\pm 0.19$	1.59* $\pm 0.16$	0.88* $\pm 0.13$	1.35* $\pm 0.04$	1.51* $\pm 0.08$
	1 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	1.50* $\pm 0.09$	1.63* $\pm 0.22^*$	1.75*# $\pm 0.07$	1.57* $\pm 0.08$	1.53* $\pm 0.08$	0.81* $\pm 0.10$	1.22 $\pm 0.13$	1.41*# $\pm 0.03$
	2 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	1.30* $\pm 0.04$	1.64* $\pm 0.14$	1.53* $\pm 0.17$	1.43* $\pm 0.09$	1.35*# $\pm 0.10$	0.81* $\pm 0.10$	1.37* $\pm 0.04$	1.40* $\pm 0.08$
<b>Liver</b> ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	Untreated	5.10 $\pm 0.20$	5.25 $\pm 0.18$	5.53* $\pm 0.29$	5.99* $\pm 0.66$	6.64* $\pm 0.82$	6.65* $\pm 0.83$	6.52* $\pm 0.59$	4.92 $\pm 0.18$	5.80* $\pm 0.70$	7.49* $\pm 1.88$
	1 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	5.31 $\pm 0.60$	5.87* $\pm 0.31^*$	6.43* $\pm 0.67$	6.52* $\pm 0.67$	6.57* $\pm 0.52$	5.69*# $\pm 0.31$	5.99* $\pm 0.60$	5.76 $\pm 0.73$
	2 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	4.73*# $\pm 0.17$	5.82 $\pm 0.71$	6.80* $\pm 0.96^*$	6.37* $\pm 0.14$	6.15* $\pm 1.29$	5.27 $\pm 0.45$	5.73 $\pm 0.80$	5.63*# $\pm 0.20$
<b>Kidney</b> ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	Untreated	13.38 $\pm 4.69$	17.94 $\pm 4.95$	11.9 $\pm 4.69$	13.46 $\pm 6.65$	11.64 $\pm 2.81$	10.74 $\pm 4.41$	9.78 $\pm 3.32$	5.42* $\pm 0.87$	5.33 $\pm 1.28$	6.34* $\pm 0.88$
	1 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	19.24 $\pm 6.09$	13.98 $\pm 6.45$	10.20 $\pm 2.07$	9.58 $\pm 2.16$	10.58 $\pm 2.29$	4.98* $\pm 0.96$	6.98* $\pm 1.61$	6.20* $\pm 0.75$
	2 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	19.00 $\pm 4.78$	13.38 $\pm 2.32$	12.16 $\pm 3.20$	8.82 $\pm 2.03$	10.88 $\pm 2.03$	7.22* $\pm 2.61$	5.48 $\pm 0.70$	6.20* $\pm 1.47$
<b>Intestine</b> ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	Untreated	1.80 $\pm 0.15$	2.03* $\pm 0.34$	1.99 $\pm 0.53$	2.06 $\pm 0.35$	2.22 $\pm 0.57$	1.74 $\pm 0.14$	1.76 $\pm 0.15$	1.59 $\pm 0.20$	1.69 $\pm 0.07$	1.67 $\pm 0.08$
	1 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	1.45 $\pm 0.43$	2.26* $\pm 0.37^*$	2.33* $\pm 0.13$	1.92# $\pm 0.11$	1.99* $\pm 0.14$	1.78 $\pm 0.11$	1.99*# $\pm 0.12$	1.94# $\pm 0.18$
	2 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	1.55# $\pm 0.21$	2.02 $\pm 0.25$	2.03* $\pm 0.12$	2.01*# $\pm 0.15$	1.91 $\pm 0.47$	1.64 $\pm 0.21$	2.00# $\pm 0.20$	2.06*# $\pm 0.17$

Data are presented as means ( $n = 5$ )  $\pm$  SD and are expressed, in organs, on a wet weight basis.

\*  $p < 0.05$  : comparison to initial values (T0).

#  $p < 0.05$  : comparison of Zn treated series to untreated series, on the same day.

**Table 3.** Evolution of total glutathione (GSH) and thiol groups (SH) in untreated and Zn supplemented rats after a 20% or 40% TBSA.

Zn gluconate	T0	20 % group						40 % group			
		H6	D1	D2	D3	D4	D5	D1	D3	D5	
<b>GSH</b> ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	Untreated	1011 $\pm 131$	1047 $\pm 119$	860 $\pm 199$	763* $\pm 79$	878* $\pm 73$	796* $\pm 120$	917 $\pm 58$	977 $\pm 196$	802* $\pm 100$	879* $\pm 44$
	1 mg/kg per day	/	/	882 $\pm 71$	748* $\pm 54$	904 $\pm 47$	877* $\pm 52$	819*# $\pm 68$	1004 $\pm 231$	849* $\pm 71$	938 $\pm 155$
	2 mg/kg per day	/	/	855* $\pm 96$	768* $\pm 94$	903 $\pm 111$	860* $\pm 94$	881* $\pm 51$	876 $\pm 135$	891 $\pm 78$	850 $\pm 160$
<b>SH</b> ( $\text{mmol.g}^{-1}$ proteins)	Untreated	5.16 $\pm 0.34$	5.18 $\pm 0.35$	3.97* $\pm 0.17^*$	3.03* $\pm 0.36$	3.40* $\pm 0.33$	3.43* $\pm 0.22$	3.53* $\pm 0.30$	3.06* $\pm 0.13$	2.37* $\pm 0.12$	2.39* $\pm 0.26$
	1 mg/kg per day	/	/	3.63*# $\pm 0.20$	3.31* $\pm 0.26$	3.23* $\pm 0.23$	3.36* $\pm 0.16$	3.81* $\pm 0.30$	3.23* $\pm 0.49$	2.13* $\pm 0.28$	2.79* $\pm 0.45$
	2 mg/kg per day	/	/	3.86* $\pm 0.17$	3.21* $\pm 0.23$	3.06*# $\pm 0.17$	2.96*# $\pm 0.32$	3.67* $\pm 0.16$	3.08* $\pm 0.26$	2.23* $\pm 0.17$	2.70* $\pm 0.47$

Data are presented as means ( $n = 5$ )  $\pm$  SD.

\*  $p < 0.05$  : comparison to initial values (T0).

#  $p < 0.05$  : comparison of Zn treated series to untreated series, on the same day.

GSH was determined in deproteinized whole blood, SH in plasma.

**Table 4.** Evolution of GPx levels in blood and organs of untreated and Zn supplemented rats after a 20% or 40% TBSA burn.

	Zn gluconate	T0	20 % group					40 % group			
			H6	D1	D2	D3	D4	D5	D1	D3	D5
<b>Blood</b> (U.g <sup>-1</sup> Hb)	Untreated	663 ± 130	568 ± 69	566 ± 56	546 ± 50	667 ± 101	661 ± 178	867* ± 126	844* ± 116	636 ± 91	745 ± 35
	1 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	536* ± 51	570 ± 20	718 ± 71	827 ± 142	793 ± 106	674 # ± 98	685 ± 119	698 ± 105
	2 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	495* ± 45	572 ± 33	731 ± 145	713 ± 62	717 ± 180	775 ± 85	720 ± 72	713 ± 58
<b>Liver</b> (U.g <sup>-1</sup> proteins)	Untreated	1413 ± 161	1593 ± 191	1577 ± 125	1576 ± 192	1640* ± 236	1407 ± 170	1523 ± 139	1734* ± 93	1349 ± 194	1314 ± 140
	1 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	1524 ± 91	1548 ± 341	1535 ± 148	1402 ± 63	1420 ± 182	1601 ± 172	1248 ± 237	1304 ± 290
	2 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	1376 # ± 41	1553 ± 209	1517 ± 214	1556 ± 90	1586 ± 122	1580 ± 264	1266 ± 98	1231 ± 117
<b>Kidney</b> (U.g <sup>-1</sup> proteins)	Untreated	1000 ± 104	1051 ± 73	1123 ± 131	1197* ± 96	1077 ± 122	1206* ± 69	1225* ± 75	1002 ± 72	1088 ± 104	1031 ± 79
	1 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	1011 ± 69	1187* ± 86	1213* ± 111	1156 ± 145	1181* ± 105	926 ± 118	1141* ± 110	1070 ± 90
	2 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	955 # ± 68	1241 ± 190	1161 ± 164	1171 ± 114	1224* ± 118	1077 ± 154	1080 ± 115	1133* ± 71
<b>Muscle</b> (U.g <sup>-1</sup> proteins)	Untreated	172 ± 26	138 ± 33	141 ± 22	118 ± 31	180 ± 72	189 ± 53	133 ± 32	198 ± 60	183 ± 55	163 ± 46
	1 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	179 ± 52	142 ± 33	125 ± 44	146 ± 45	146 ± 57	163 ± 33	200 ± 58	140 ± 53
	2 mg.kg <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	/	/	145 ± 63	125* ± 16*	129* ± 12	119* # ± 32	123* ± 41	127* ± 29	185 ± 90	166 ± 66

Data are presented as means ( $n = 5$ ) ± SD.

\*  $p < 0.05$  : comparison to initial values (T0).

#  $p < 0.05$  : comparison of Zn treated series to untreated series, on the same day.

**Table 5.** Evolution SOD levels in RBC and organs of untreated and Zn supplemented rats after a 20% or 40% TBSA burn.

Zn gluconate		T0	20 % group					40 % group			
			H6	D1	D2	D3	D4	D5	D1	D3	D5
<b>RBC</b> (U.g <sup>-1</sup> Hb)	Untreated	2390 ± 139	2628* ± 136	2557 ± 139	2482 ± 221	2682* ± 281	2513 ± 77	2473 ± 108	2368 ± 108	2583* ± 135	2599 ± 224
	1 mg/kg per day	/	/	2523 ± 124	2370 ± 139	2987* ± 409	2550* ± 95	2549* ± 101	2418 ± 135	2449 ± 184	2663* ± 189
	2 mg/kg per day	/	/	2521 ± 260	2455 ± 110	2456 ± 87	2526 ± 165	2548* ± 79*	2504 ± 168	2708* ± 188	
<b>Liver</b> (U.g <sup>-1</sup> proteins)	Untreated	20050 ± 610	21444 ± 1919	21214* ± 872	21561 ± 2272	23864* ± 1981	22750* ± 1750	22121* ± 1088	23151* ± 1383	22242 ± 2117	21790* ± 1605
	1 mg/kg per day	/	/	22269* ± 2144	21847 ± 2640	20842# ± 927	22727* ± 767	21369* ± 924	22508* ± 1804	20281 ± 1774	22653* ± 1033
	2 mg/kg per day	/	/	21605* ± 1069	23523* ± 1715	21149 ± 1379	21381 ± 1401	21101 ± 1921	22342* ± 2095	21811 ± 1820	20162 ± 1505
<b>Kidney</b> (U.g <sup>-1</sup> proteins)	Untreated	7434 ± 163	7247 ± 443	7526 ± 465	7275 ± 368	8528 ± 970	8498* ± 547	8995* ± 793	9309* ± 1226	9335* ± 729	9432* ± 1033
	1 mg/kg per day	/	/	7405 ± 891	7894 ± 633	8738* ± 662	8520* ± 688	8380* ± 373	8708* ± 248	9068* ± 612	9741* ± 448
	2 mg/kg per day	/	/	7474 ± 835	8035* # ± 517	8642* ± 724	8400* ± 894	8085 ± 649	9526* ± 579	9499* ± 434	10214* ± 440
<b>Muscle</b> (U.g <sup>-1</sup> proteins)	Untreated	4116 ± 402	4059 ± 479	3891 ± 169	4257 ± 409	4232 ± 341	4570 ± 501	4247 ± 228	4362 ± 420	4514 ± 481	4814* ± 412
	1 mg/kg per day	/	/	4420 # ± 437	4400 ± 356	4014 ± 174	4211 ± 416	4319 ± 341	4328 ± 312	4822 ± 369	4764 ± 486
	2 mg/kg per day	/	/	4267 ± 562	3936 ± 304	3964 ± 316	4177 ± 400	3779 ± 587	4218 ± 554	4621 ± 795	5099* ± 838*

Data are presented as means ( $n = 5$ )  $\pm$  SD.

\*  $p < 0.05$  : comparison to initial values (T0).

#  $p < 0.05$  : comparison of Zn treated series to untreated series, on the same day.

### **3. Expérimentation V : Effets du statut en Zn sur les changements induits par la brûlure au niveau de la métallothionéine-I et de transporteurs du Zn (ZnT-1, ZnT-4, Zip2, Zip4).**

Cette partie du travail a donné lieu à une publication soumise à « Journal of Nutritional Biochemistry » sous le titre « Burn-induced changes in hepatic ZnT and MT using a rat model of thermal aggression : Effect of zinc status. »

#### **3.1. Objectifs**

La cellule dispose d'un ensemble de protéines permettant de transporter ou de stocker le Zn dans les différents compartiments cellulaires et régulant ainsi l'homéostasie de cet élément-trace. Deux superfamilles de transporteurs mammaliens du Zn ont été identifiées. Les membres de la famille « Solute Carrier 30a » (Slc30a), appelés ZnTs, diminuent la concentration intracellulaire en Zn en agissant sur l'efflux ou la compartimentalisation de cet élément. Les membres de la famille Slc39a, appelés Zip, augmentent la teneur intracytoplasmique en Zn en captant le Zn extracellulaire et probablement intravésiculaire. Il existe également les métallothionéines pouvant lier jusqu'à sept atomes de Zn. Les transporteurs du Zn et les MTs, ayant des liens étroits avec le Zn, peuvent être de bons indicateurs sur le statut ainsi que les mouvements de cet élément. Hors, nous avons montré précédemment qu'une subdéficience ou une supplémentation en Zn modifiaient l'évolution du stress oxydant, de l'insulino-résistance et de la concentration plasmatique et hépatique en Zn, chez l'animal brûlé. C'est pourquoi, nous avons réalisé une étude moléculaire sur le rôle potentiel des transporteurs dans cette régulation post-traumatique.

Dans cette expérience, sur notre modèle animal de brûlure thermique, nous avons examiné, tout d'abord, l'impact de la brûlure, puis, les effets de la supplémentation en Zn sur l'expression des transporteurs ZnT-1, ZnT-4, Zip2 et Zip4 et de la MT-I, au niveau hépatique, les cinq premiers jours suivant la brûlure.

#### **3.2. Protocole**

Les protocoles de brûlure, de prélèvements tissulaires et de dosages des ARNm sont décrits en annexe.

Les prélèvements permettant de réaliser cette étude ont été réalisés lors de l'expérimentation précédente (expérimentation IV) uniquement aux temps T0, J1, J3 et J5 et sur les animaux brûlés sur 20% SC. A titre de rappel, les animaux sont sub-carencés en Zn (10 ppm). De plus, pour chaque jour de prélèvements, il y a trois groupes de rats : deux groupes traités recevant respectivement 1 et 2 mg/kg de gluconate de Zn en intrapéritonéale (IP), six heures après la brûlure puis quotidiennement jusqu'au sacrifice et un groupe « non traité » recevant, dans les mêmes conditions, du sérum physiologique en IP.

Les paramètres suivants ont été évalués :

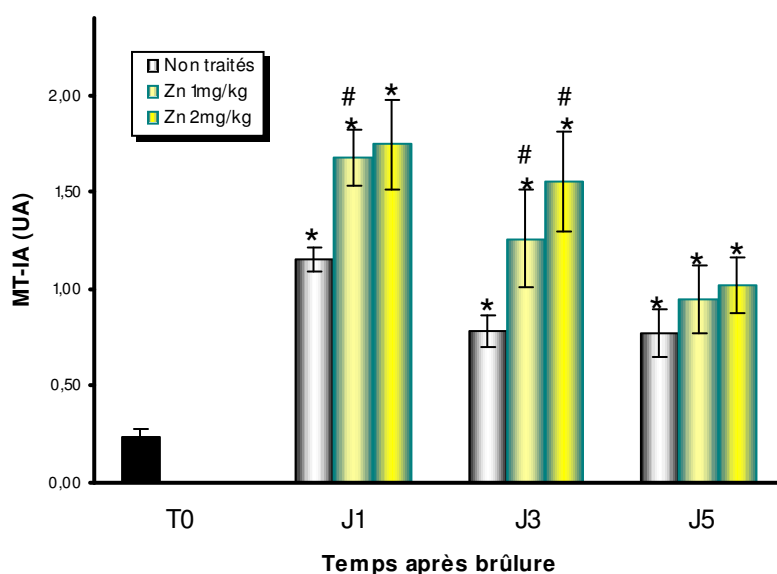
Les quantités d'ARNm hépatique en MT-I.

Les quantités d'ARNm hépatique en Zn-T1, Zn-T4, Zip2 et Zip4.

### 3.3. Principaux Résultats

#### 3.3.1. Effets de la brûlure

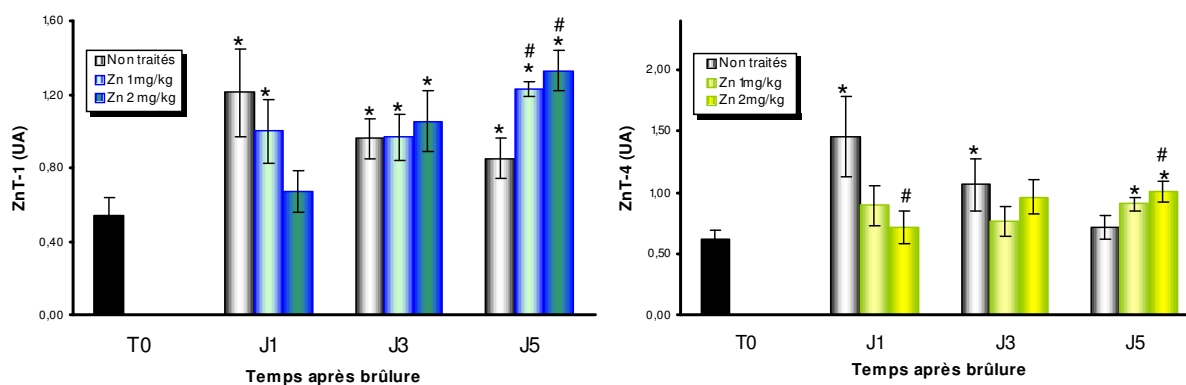
La brûlure entraîne une expression hépatique considérablement accrue de l'ARNm de MT-I, ZnT-4 et ZnT-1, avec une augmentation minimum respectivement de 330 %, 170 % et 150 %. Ce niveau élevé d'expression est maintenu durant les cinq jours suivant la brûlure, excepté pour ZnT-4 qui retrouve, à J5, un niveau comparable à la valeur « témoin ». L'expression de Zip2 est augmentée significativement seulement à J5. Enfin, Zip4 n'est pas perturbé par la brûlure (figure 40 à 42).



**Figure 40 :** Evolution de l'expression de l'ARNm de MT-IA hépatique chez les rats traités ou non par des injections de Zn, après brûlure de 20%. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM. \*  $p < 0.05$  : comparaison à T0. #  $p < 0.05$  : rats traités versus rats non traités, le même jour.

► La surexpression hépatique de MT permet une captation accrue du Zn au niveau de cet organe cible. L'augmentation de la concentration hépatique en Zn vérifie cette propriété. Ce transfert de Zn participerait à la protection de cet organe ainsi qu'au métabolisme hépatique accru par la brûlure.

► L'oxydation des résidus sulfhydryles de MT par les radicaux libres contribue à la défense antioxydante. Dans la mesure où de nombreux systèmes de défenses antioxydantes sont altérées par la brûlure, la MT protégerait l'organisme des ERO.



**Figure 41 : Evolution de l'expression de l'ARNm de ZnT-1 et ZnT-4 hépatiques chez les rats traités ou non par des injections de Zn, après brûlure de 20%.**  
 Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM. \*  $p < 0.05$  : comparaison à T0. #  $p < 0.05$  : rats traités versus rats non traités, le même jour.

► La surexpression hépatique de ZnT-1 et ZnT-4 pourrait jouer un rôle physiologique dans l'apport en urgence de Zn aux tissus traumatisés. Cependant, l'accroissement apparent de l'efflux de Zn n'est pas en accord avec la rétention hépatique de Zn mesurée.

► Zip2 joue un rôle dans l'accumulation hépatique de Zn, après un traumatisme telle la brûlure.

► Après brûlure, Zip4 ne semble pas primordial, dans le foie, pour réguler la teneur en Zn.

### 3.3.2. Conséquences d'un apport en zinc

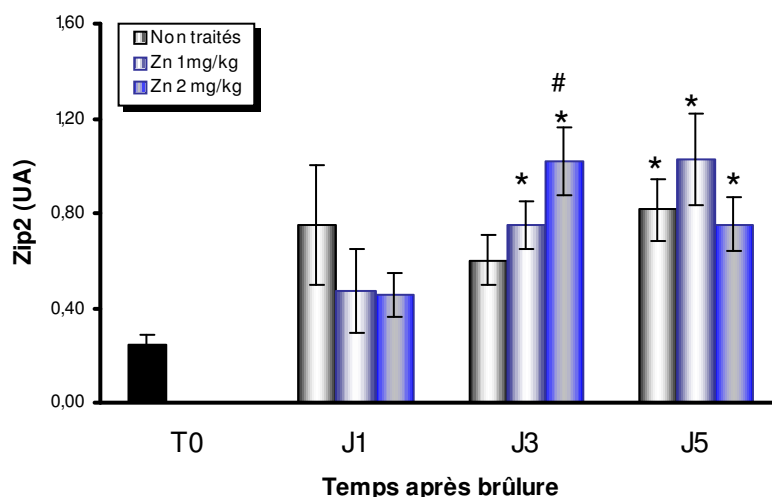
Les injections répétées de Zn ont renforcé, de manière dose-dépendante, l'augmentation de MT, à J1 et J3 (**figure 40**).

► Au vu des propriétés de MT, un apport en Zn semble bénéfique à l'organisme brûlé.

Concernant ZnT-1 et ZnT-4, la supplémentation abaisse, tout d'abord, l'expression des ARNm à des valeurs comparable aux valeurs T0 (à J1 pour ZnT-1 ; à J1 et J3 pour ZnT-4). Puis, à J5, l'effet opposé se produit avec une augmentation significative par rapport à T0 et aux rats non traités (**figure 41**).



► Le traitement induit des modifications qui s'opposent aux évolutions physiologiques. Par conséquent, la supplémentation précoce pourrait entraîner des effets non recherchés voire néfastes pour la cellule hépatique.



**Figure 42 : Evolution de l'expression de l'ARNm de Zip2 hépatique chez les rats traités ou non par des injections de Zn, après brûlure de 20%.** Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM. \*  $p < 0.05$  : comparaison à T0. #  $p < 0.05$  : rats traités versus rats non traités, le même jour.

Les apports en Zn augmentent, de manière transitoire, l'expression de l'ARNm de Zip2, à J3 (figure 42) alors qu'ils ne modifient pas Zip4 significativement.

► Chez les rats brûlés, un apport en Zn ne modifie pas significativement l'expression de Zip2 et Zip4. On ne peut pas exclure une régulation plus tardive ou la mise en place de mécanismes post-traductionnels.

### 3.4. Conclusion

La brûlure ainsi que les injections de Zn post-traumatique induisent des modifications de l'expression hépatique de MT et des transporteurs du Zn. Concernant la MT, l'évolution après brûlure est en accord avec les études antérieures. Le traitement, qui accroît l'expression de MT, semble bénéfique à l'organisme brûlé. L'évolution des transporteurs du Zn, après brûlure et après traitement, est plus aléatoire et pas toujours corrélée avec le statut en Zn. Cependant, la compréhension des mécanismes moléculaires qui régulent l'homéostasie du Zn chez les patients brûlés est importante car le dysmétabolisme du Zn post-brûlure est la source d'une multitude d'effets délétères durant la période de soins intensifs.

C'est la première fois qu'une étude sur l'évolution des transporteurs de Zn après brûlure est entreprise. Par conséquent, elle ouvre un nouveau terrain de réflexion sur la régulation de cet élément après un tel traumatisme.

### **3.5. Article soumis à « Journal of Nutritional Biochemistry »**



**Burn-induced changes in hepatic ZnT and MT using a rat model of thermal aggression:  
Effect of zinc status.**

Richard Claeysen<sup>1,2</sup>, Maud Andriollo-Sanchez<sup>1</sup>, André Peinnequin<sup>1</sup>, Diane Agay<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, 24 Avenue des Maquis du Grésivaudan, BP87, 38702 La Tronche cedex, France.

<sup>2</sup> INSERM U884, Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble cedex 9, France.

Corresponding author and address for proofs:

Diane Agay  
CRSSA  
24 Avenue des Maquis du Grésivaudan  
BP 87  
38702 La Tronche Cedex  
France

Telephone number: +33 4 76 63 69 80

Fax number: +33 4 76 63 69 22

E-mail: [diane.agay@crssa.net](mailto:diane.agay@crssa.net)

**Summary**

Zinc (Zn) is critical for the functional and structural integrity of cells. Several proteins such as Zn transporters (ZnTs and Zip) and metallothioneins (MTs) are implicated in both regulation and movements of this trace element. mRNA expression of ZnTs, Zip and MTs are modified by both Zn deficiency and Zn supplementation. A severe burn injury induces an impaired Zn status and necessitates Zn supplementation. Consequently, the aim of this study was to investigate, in an animal model of thermal injury, both impact of burn and effects of Zn supplementation on ZnTs and Zip transporters and on MTs, in the liver, within the first five days after burn injury. Burn has induced a strong increase of MT-I, ZnT-4 and ZnT-1 genes expression from 24h until 5<sup>th</sup> day after burn. Zip2 mRNA level was significantly increased only at D5. Zip4 was not disrupted by burn. Zn supplementation has positively enhanced evolution of MT-IA. Concerning ZnT-1 and ZnT-4, treatments have first led to a decrease of their mRNA level and then induced an increase at D5. Zip2 and Zip4 were little-modified by treatments. These data show that both burn injury and postburn Zn injections have affected expression of MTs and Zn transporters in the liver. Increase of MT could protect organism against free radicals attacks. Evolution of Zn transporters was not necessarily expected in this way; nevertheless, given that it is the first time such a study was achieved on these elements, it opens new reflection pathways on Zn homeostasis after burn.

**Keywords:**

Zinc transporters, metallothionein, burn, zinc supplementation

### Introduction

Movement of zinc (Zn) into and out of cells and subcellular organelles is mediated by Zn transporters proteins. Members of ZnT family transporters are reported to reduce intracellular cytoplasmic Zn by enhancing Zn efflux from cells or into intracellular vesicles, while Zrt-, Irt-like (Zip) family transporters increase intracellular cytoplasmic Zn by promoting extracellular and, possibly, vesicular Zn transport into cytoplasm [1]. In rats, gene expression of these transporters was shown to depend upon dietary Zn availability [2, 3]. Liuzzi et al have identified that ZnT-1, 2 and 4 mRNA levels have different responses to dietary zinc [2]. Furthermore, the tissue specificity of ZnT expression is a function of dietary Zn intake. Another important proteins implicated in the homeostasis of Zn is metallothionein (MT). MT is a small cysteine-rich metal-binding protein that can bind up to seven atoms of Zn per molecule [4]. There is evidence that both Zn deficiency and Zn supplementation alter MT mRNA expression [5, 6]. Consequently, Zn transporters and MTs can be good indicators of Zn movements and status.

It is well known that burn injury necessitates increased nutritional requirements associated with the resulting hypermetabolic rate [7] and the body losses [8-10]. Among the nutrients required for supplementation trace elements need greater attention because stress alters the level of these trace elements due to altered intestinal absorption, altered body losses, altered distribution among body proteins and altered protein concentration [11, 12]. Trace elements are potentially important in burn since they are directly involved in free radical scavenging [13], in immunity [14] and in tissue repair [15]. Previously, our team demonstrated early burn-induced alterations of trace elements [16]. We have then performed experiments to elucidate evolution of selenium status and to elucidate potential role of selenium supplementation [17]. We are now focused on Zn, an other essential trace-element and have already demonstrated implications of impaired Zn status on oxidative stress and insulin

resistance after burn [18, 19]. Our current observations concerning Zn supplementation after burn injury have showed important modifications of Zn levels in the plasma and liver compartments whereas no effect in antioxidant defences was detected. That is why we have decided to investigate potential role of Zn transporters in this post-traumatic regulation, in our well-established model of thermal injury. Moreover, to our knowledge, it is the first study which was focused on Zn transporters after burn injury. Two superfamilies of mammalian Zn transporters have been identified that belong to the solute carrier (Slc)30a and Slc39a families. Slc30a members, named ZnTs, function in Zn efflux and compartmentalization. Members of the Slc39a, named Zips, function in the uptake of Zn [20]. ZnT-1, Zip2 and Zip4 were chosen for both their great sensibility and specificity for Zn [2, 21, 22]. ZnT-4 was an investigation choice since its regulation was scarcely described.

In this study, in an animal model of severe thermal injury consisting in rats previously depleted in zinc before aggression, in order to mimic the sub-deficient status of the patients, we decided to examine, first, the impact of burn on ZnT and Zip transporters and on MTs and, then, the effects of Zn supplementation on these elements within the first five days after burn injury.

## **Materials and Methods**

### ***Animal care***

The animal experiment was performed in accordance with French ethical guidelines to minimize pain and suffering to the rats and the procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the French Defense Medical Research Centre.

Three weeks old male Wistar rats were purchased from Charles River Laboratories (Saint Germain sur l'Arbresle, France). Animals were housed in thermoformed polystyrene cages,

first by four and then individually relating to their body weight, according to the zootechnical standards prescribed by Agriculture and Environment Ministry for laboratory rodents. As early as their weaning, 50 rats were conditioned with a zinc depleted diet (10 ppm of Zn) purchased from SAFE (Epinay sur Orge, France), as previously described [18]. The water was demineralized to avoid zinc contamination. During the conditioning period, for eight weeks, each animal was handled daily to minimize experimental stressors and weighed every week, in order to follow its growth curve. After experimental injury, the food and the litter were sterilized to limit bacterial contamination risk for the immunodepressed burned animals.

#### *Experimental design*

The 50 depleted animals were divided as follow: a first group of five rats corresponded to non-burned depleted rats used for initial values (T0); the others rats were pooled into three series of 15 rats, before being submitted to burn injury. Animals of each series were sacrificed one day (D1), three days (D3) and five days (D5) after the thermal injury involving 20 % total body surface area (TBSA).

In burned rats, a zinc treatment or a control treatment was begun as soon as six hours after injury and then injected daily until the sacrifice. Each series were consequently subdivided into three groups receiving optionally intraperitoneal injections of physiological saline solution for the “untreated” rats, or intraperitoneal injections of zinc gluconate at 1 mg.kg<sup>-1</sup> or at 2 mg.kg<sup>-1</sup> for the two others “treated” series.

#### *Experimental thermal injury*

According to procedure defined by Walker and Mason, [23] a non lethal third-degree thermal injury involving 20% TBSA was applied to the animals as previously described. [18, 19] Briefly, under anesthesia, the dorsal skin of the rats was immersed in a boiling water bath



at 100°C for 10 sec. As this procedure leads to a full thickness skin burn of third degree, nervous terminations are histologically and functionally destroyed. The skin lesions appear painless and are also well-tolerated by the rats. Therefore, no analgesic was further required for the burned animals.

#### ***Blood and tissue samples***

After an overnight fast of the rats, blood and liver were sampled under halothane anesthesia as precisely described in our preliminary studies. [18, 24] Briefly, the blood was collected after laparotomy in trace-element-free syringes by vena cava puncture. After blood centrifugation (10 min; 3000g; 4°C), the plasma was removed and collected in trace elements-free microtubes and stored at -80°C until analysis. Liver was sampled in mineral-free tubes, without any preparation, at -80°C.

#### ***Molecular biology assessment***

##### ***mRNA isolation and reverse transcription (RT)***

The liver samples were homogenized ( $5 \mu\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) with, first, a grinder polytron® PT4000 (Kinematica AG, Littau, Switzerland) and, then, with a mixer mill MM300 (Rescht, Haan, Germany) in guanidine thiocyanate lysis buffer (buffer RLT, Qiagen, Courtaboeuf, France; 30 Hz, 2 min; 2 tungsten 2 mm, carbide beads).

The extraction of mRNA was carried out on the MagNA Pure LC instrument (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) with Isolation kit II (tissue) from 40  $\mu\text{L}$  of liver lysate (8 mg of tissue). A 50  $\mu\text{L}$  final volume of mRNA was eluted for each sample.

Reverse transcription was immediately performed using the Reverse Transcription Core Kit (Eurogentec, Saraing, Belgium). The reaction was carried out from 4  $\mu\text{L}$  of mRNA (0.6 mg of

tissue) with 50  $\mu\text{M}$  Oligod(T)15 primer and Rnase inhibitor (2 UI). The cDNA was stored at -80°C until use.

#### *Primer design*

The primer design and its optimization regarding the primer dimer, the self-priming formation and the primer melting temperature were performed with MacVector software (Accelrys, San Diego, USA). The specificities of the polymerase chain reaction (PCR) amplification were documented with the LightCycler melting curve analysis as previously described [25]. The melting peaks obtained either from the RT-product and from the specific recombinant DNA were identical. The oligonucleotide primers were synthesized by Eurogentec (Saraing, Belgium).

The selected forward (F) and reverse (R) primers as well as detailed PCR conditions are shown in Table 1.

#### *Real time PCR*

PCR was carried out with the LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) using 0.25  $\mu\text{L}$  of cDNA (15  $\mu\text{g}$  of tissue) ([à verifier](#)), in a 20  $\mu\text{L}$  final volume, 4mM  $\text{MgCl}_2$  and 0.4  $\mu\text{M}$  of each primer (final concentration). Quantitative PCRs were performed using the same LightCycler for 50 cycles of 95°C for 20s (denaturation), 55°C (ZnT-4, Zip2, Zip4), 57°C (GAPDH, ARBP, CycA), 58°C (MT-1A, ZnT-1), 60°C (HPRT) for 5s (annealing temperature, which is primer and structure dependent) and a final step of 8s at 72°C (elongation). The amplification specificity was checked using the melting curve. The crossing point ( $C_p$ ) values were calculated from LightCycler Software v.3.5 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) using the second derivative maximum method. The quantification was achieved using a pool of cDNA samples

as calibrator [25], according to the comparative threshold cycle method [26]. The relative mRNA values were calculated with the RelQuant software (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). The normalization was performed by geometric averaging of three or four internal control genes [27]: ARBP, GAPDH, HPRT and CycA. Expression stability of the potential reference genes was assessed using GENORM software. The pairwise variations was below 0.15, the threshold below which the inclusion of an additional control gene is not required (0.133). The ARBP, GAPDH, HPRT and CycA genes were affected neither by the treatment nor by the environmental conditions.

#### *Zinc and analysis*

Zinc concentrations in acid dilutions of plasma samples and tissue ashes were determined by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) with a Perkin-Elmer 560 model (Norwalk, CT, USA) using previously described methods. [28]Plasma was five fold diluted in hydrochloric acid 0.1M, whereas liver was wet ashed with nitric acid 14M. The ready to use 1 g.L<sup>-1</sup> zinc stock standard solution (Merck, Darmstadt, Germany) was used to prepare calibrants in the range of 1 to 6 µmol.L<sup>-1</sup>.

Seronorm® trace element serum (Sero, Billingstad, Norway) and NIST-SRM 1577b bovine liver powder (National Institute of Standards & Technology, Gaithersburg, MD, USA) were used as internal quality control, respectively for plasma and liver. In the liver, data were expressed as micrograms of Zn per gram of organ wet weight.

#### *Statistical analysis*

All results are expressed as means ± SD. The global course of each parameter was evaluated by Kruskal and Wallis rank test and then the comparisons between controls and burned groups or between untreated and zinc supplemented groups were performed with non-

parametric rank sum tests (Mann and Whitney tests) using Statistica 7.1 software (StatSoft, France). Differences were considered statistically significant when  $p$  values were less than 0.05.

## Results

Zn deficient rats had no significant reduced weight gain compared with controls (data not shown).

### *Zn level*

The skin burn induced an early and significant decrease of plasma Zn levels in animals, as soon as 6 hours after injury (Figure 1). Without any Zn administration, the plasma Zn level remained significantly reduced during five days after thermal injury. The course of Zn level in red blood cells (RBC) was similar (data not shown). Repeated injections of Zn gluconate at  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  have restored plasma Zn levels within two days. After Zn injections at  $2 \text{ mg.kg}^{-1}$ , Zn levels came back to initial value within one or two days and even overran this value after a few days (D2).

Contrary to what was observed in blood compartment, the Zn level increased in liver after burn injury (Figure 2). The Zn treatments enhanced this evolution with significant increases of Zn levels observed a few days after burn, at  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  or more markedly at  $2 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Indeed, Zn concentration has achieved a twofold increase with the highest dose of Zn supplementation.

In other deep organs, as femur, muscle, kidney and intestine, the Zn levels remained relatively stable after burn. In kidney and in intestine, the supplementation led to an increase of Zn levels (data not shown).

### *Molecular biology data*

In liver, thermal burn induced a strong significant increase of MT-1, ZnT-4 and ZnT-1 genes expression from 24h until 5<sup>th</sup> day after burn with, respectively, a minimum increase of 330 %, 170 and 150 %. These increases were relatively stable during the experiment except for ZnT-4 mRNA level which has reached control value at D5. Zip2 mRNA level was significantly increased after burn only at D5. Finally, the thermal injury had no effect on Zip4 mRNA level (Figure 3,4,5).

The treatment, consisting in repeated intraperitoneal injections of Zn, had enhanced the above-mentioned evolution of MT-1A mRNA level at D1 and D3. This effect was slightly more elevated with the “2 mg.kg<sup>-1</sup>” dose (Figure 3). The same observations can be done for ZnT-1, but only at D5. We can mention that ZnT-1 mRNA level return to normal value, at D1, with injections of 2 mg.kg<sup>-1</sup> of Zn (Figure 4). For ZnT-4 mRNA level, Zn supplementation has induced the same noting, but at D1 and D3 and for both doses. However, an opposite effect has occurred at D5 with significantly increases in regard to T0 and to untreated groups (Figure 5). Injections have lead to a temporary Zip2 mRNA increase at D3 which was significant, compared to untreated group, with 2 mg.kg<sup>-1</sup> dose (Figure 6). Zip4 mRNA level was not strongly disrupted by Zn supplementation. Nevertheless, a lowered tendency seems to take place after injections at D1 and D3 (Figure 7).

### **Discussion**

This experiment is in keeping with the general pattern of investigation on both Zn evolution and role after a thermal injury. Indeed, clinical protocols for trace elements supply, in burned patients' recovery centers, are not standardized and many differences between the care units are noticed in relation with galenic forms, dosages or administration frequency of prescribed trace elements [29]. For instance, regarding Zn, a factor 35 was found in administered doses

between the least and the most supplemented protocols. This enlightens a lack of studies concerning trace elements requirements in burned patients. Consequently, we have designed a model of severe burn injury in Zn sub-deficient rats [18]. We have preferred to induce a mild Zn deficiency (10 ppm) rather an acute depletion in order to have a true-to-life situation observed in patients at their hospitalization in Intensive Care Unit.

With this model, our team has previously described effect of this mild Zn deficiency on oxidative stress [18] and on insulin sensitivity [19] after burn. Then, we have determined the optimal dose of Zn gluconate which could be safely administrated in rats by intraperitoneal repeated injections [24]. We have currently submitted results concerning role of Zn supplementation on Zn status restoration and on burn-induced oxidative stress. Parallel to this last study, we have decided to lead a similar experiment to investigate effects of both burn and post-burn Zn supplementation on MT and Zn transporters and to enlighten changes in post-burn Zn regulation. To our knowledge, it was the first time such a study was performed in order to evaluate Zn transporters in thermal injury.

Our results show a decrease of plasma Zn concentration from the first day until the third day after thermal injury, returning to almost normal value the fifth day after burn. Conversely, in liver, thermal injury has induced a progressive increase of Zn level. The same tendencies were observed in others studies [16, 18, 30]. Serum zinc decrease could be due to increased cutaneous and urine losses. Liver Zn increase is associated to redistribution by a selective uptake or to acute phase reaction. Supplementation seemed to lead to retention of Zn in tissues, despite large losses excreted in faeces [24]. In a dose-dependant manner, Zn injections allowed, in plasma, to compensate the Zn depression and intensified, in liver, the elevation of Zn level noticed after burn. This Zn hepatic enhancement could be deleterious but it was not associated to any clinical or biochemical side effects (data not shown). On the contrary, Zn hepatic level was positive correlated to MT-IA mRNA level. Consequently, it could be

positive since previous studies have demonstrated beneficial effects of MT supplementation, in scalded rats, as regards oxidative parameters [31, 32]. Both uptake of Zn and subsequent transfer to critical target where Zn exhibits its protective function (liver) or oxidation of this sulfhydryl-rich protein as a sacrificial scavenger for reactive oxygen species contribute to the oxidative defence. Ding et al. have already described overexpression of liver MT (MT-1 mRNA and protein) from 3h until 48h after burn [30]. Here, we have reported that MT mRNA level, in untreated rats, was also significantly higher until 5 days postburn. Enhancement of liver MT could be due to several elements such as oxidative stress [6, 33], activated cytokines [34] or increased secretion of glucocorticoids [35]. Inasmuch as others antioxidants defences (glutathione,  $\alpha$ -tocopherol, glutathione-S-transferase, superoxide dismutase...) are considerably affected by thermal injury, MT could, in turn, exert antioxidant activities to protect the organism from free radicals.

ZnT-1 and ZnT-4 have responded to the burn in a positive mode within the five days of the experiment. ZnT- conferring Zn export activities [36], upregulation of those ZnT mRNA might lead to an increase of their proteins as a possible physiological role to allow emergency needs in injured tissues. Treatments have, first at D1, counteracted this effect and, then at D5, enhanced this phenomenon. Consequently, early Zn supplementation might be deleterious since it has provoked a decrease opposed to the physiological evolution. The observed ZnT-1 increase related to treatments at D5 was in agreement with previous Zn supplementation studies in healthy rats [2]. Upregulation of ZnT-4 in supplemented animals was more surprising since changes in Zn status have been reported not to influence its level [2]. Moreover, these apparent increases of Zn efflux activity were not in agreement with measured retention of Zn in the liver. Previous studies have demonstrated overexpression of ZnT in injured animals, but it was after a transient forebrain ischemia which leads to accumulation of cytosolic Zn caused by nitric oxide [37, 38].

positive since previous studies have demonstrated beneficial effects of MT supplementation, in scalded rats, as regards oxidative parameters [31, 32]. Both uptake of Zn and subsequent transfer to critical target where Zn exhibits its protective function (liver) or oxidation of this sulfhydryl-rich protein as a sacrificial scavenger for reactive oxygen species contribute to the oxidative defence. Ding et al. have already described overexpression of liver MT (MT-1 mRNA and protein) from 3h until 48h after burn [30]. Here, we have reported that MT mRNA level, in untreated rats, was also significantly higher until 5 days postburn. Enhancement of liver MT could be due to several elements such as oxidative stress [6, 33], activated cytokines [34] or increased secretion of glucocorticoids [35]. Inasmuch as others antioxidants defences (glutathione,  $\alpha$ -tocopherol, glutathione-S-transferase, superoxide dismutase...) are considerably affected by thermal injury, MT could, in turn, exert antioxidant activities to protect the organism from free radicals.

ZnT-1 and ZnT-4 have responded to the burn in a positive mode within the five days of the experiment. ZnT- conferring Zn export activities [36], upregulation of those ZnT mRNA might lead to an increase of their proteins as a possible physiological role to allow emergency needs in injured tissues. Treatments have, first at D1, counteracted this effect and, then at D5, enhanced this phenomenon. Consequently, early Zn supplementation might be deleterious since it has provoked a decrease opposed to the physiological evolution. The observed ZnT-1 increase related to treatments at D5 was in agreement with previous Zn supplementation studies in healthy rats [2]. Upregulation of ZnT-4 in supplemented animals was more surprising since changes in Zn status have been reported not to influence its level [2]. Moreover, these apparent increases of Zn efflux activity were not in agreement with measured retention of Zn in the liver. Previous studies have demonstrated overexpression of ZnT in injured animals, but it was after a transient forebrain ischemia which leads to accumulation of cytosolic Zn caused by nitric oxide [37, 38].



because Zn dysregulation after burn could cause a multitude of negative effects during period of intensive care. It is the first time such a study was achieved on Zn transporters after burn. Consequently, it opens new reflection pathways on Zn homeostasis after burn.

**Acknowledgements**

We thank C. Mouret, H. Chaussard, D. Coulon, A. Zocaro (CRSSA, Grenoble) for their excellent technical assistance.

This work was supported by a grant from Délégation Générale à l'Armement (DGA, France).

**Conflict of interest statement**

The authors have no financial or proprietary interest in the subject matter.

**References**

- [1] Liuzzi JP, Cousins RJ. Mammalian zinc transporters. *Annu Rev Nutr.* 2004;24:151-72.
- [2] Liuzzi JP, Blanchard RK, Cousins RJ. Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. *J Nutr.* 2001;131:46-52.
- [3] Pfaffl MW, Windisch W. Influence of zinc deficiency on the mRNA expression of zinc transporters in adult rats. *J Trace Elem Med Biol.* 2003;17:97-106.
- [4] Beattie H, Bremner I. Metallothioneins: their cellular function and relationship with zinc. In: Roussel AM, Anderson RA, Favier AE, eds. *Trace elements in man and animals.* New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2000:961-967.
- [5] Davis SR, Cousins RJ. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J Nutr.* 2000;130:1085-8.
- [6] Andrews GK. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol.* 2000;59:95-104.
- [7] Herndon DN, Tompkins RG. Support of the metabolic response to burn injury. *Lancet.* 2004;363:1895-902.
- [8] Berger MM, Cavadini C, Bart A, Mansourian R, Guinchard S, Bartholdi I, Vandervale A, Krupp S, Chioloro R, Freeman J, et al. Cutaneous copper and zinc losses in burns. *Burns.* 1992;18:373-80.
- [9] Boosalis MG, Solem LD, Ahrenholz DH, McCall JT, McClain CJ. Serum and urinary selenium levels in thermal injury. *Burns Incl Therm Inj.* 1986;12:236-40.
- [10] Shakespeare PG. Studies on the serum levels of iron, copper and zinc and the urinary excretion of zinc after burn injury. *Burns Incl Therm Inj.* 1982;8:358-64.
- [11] Blanchet B, Jullien V, Vinsonneau C, Tod M. Influence of burns on pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs used in the care of burn patients. *Clin Pharmacokinet.* 2008;47:635-54.

- [12] Atiyeh BS, Gunn SW, Dibo SA. Metabolic implications of severe burn injuries and their management: a systematic review of the literature. *World J Surg.* 2008;32:1857-69.
- [13] Favier A. Le stress oxydant. *L'actualité chimique.* 2003:108-115.
- [14] Girodon F, Galan P, Monget AL, Boutron-Ruault MC, Brunet-Lecomte P, Preziosi P, Arnaud J, Manuguerra JC, Herchberg S. Impact of trace elements and vitamin supplementation on immunity and infections in institutionalized elderly patients: a randomized controlled trial. *MIN. VIT. AOX. geriatric network. Arch Intern Med.* 1999;159:748-54.
- [15] Lansdown AB, Mirastschijski U, Stubbs N, Scanlon E, Agren MS. Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair Regen.* 2007;15:2-16.
- [16] Agay D, Anderson RA, Sandre C, Bryden NA, Alonso A, Roussel AM, Chancerelle Y. Alterations of antioxidant trace elements (Zn, Se, Cu) and related metallo-enzymes in plasma and tissues following burn injury in rats. *Burns.* 2005;31:366-71.
- [17] Sandre C, Agay D, Ducros V, Faure H, Cruz C, Alonso A, Chancerelle Y, Roussel AM. Kinetic changes of oxidative stress and selenium status in plasma and tissues following burn injury in selenium-deficient and selenium-supplemented rats. *J Trauma.* 2006;60:627-34.
- [18] Claeysen R, Andriollo-Sanchez M, Arnaud J, Touvard L, Alonso A, Chancerelle Y, Roussel AM, Agay D. Burn-induced oxidative stress is altered by a low zinc status: kinetic study in burned rats fed a low zinc diet. *Biol Trace Elem Res.* 2008;126 Suppl 1:S80-96.
- [19] Claeysen R, Andriollo-Sanchez M, Arnaud J, Touvard L, Alonso A, Chancerelle Y, Roussel AM, Agay D. Effect of sub-deficient zinc status on insulin sensitivity after burn injury in rats. *Biol Trace Elem Res.* 2009;127:132-42.
- [20] Lichten LA, Cousins RJ. Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annu Rev Nutr.* 2009;29:153-76.

- [21] Dufner-Beattie J, Langmade SJ, Wang F, Eide D, Andrews GK. Structure, function, and regulation of a subfamily of mouse zinc transporter genes. *J Biol Chem.* 2003;278:50142-50.
- [22] Dufner-Beattie J, Wang F, Kuo YM, Gitschier J, Eide D, Andrews GK. The acrodermatitis enteropathica gene ZIP4 encodes a tissue-specific, zinc-regulated zinc transporter in mice. *J Biol Chem.* 2003;278:33474-81.
- [23] Walker HL, Mason AD, Jr. A standard animal burn. *J Trauma.* 1968;8:1049-51.
- [24] Andriollo-Sanchez M, Claeysen R, Arnaud J, Touvard L, Denis J, Chancerelle Y, Roussel AM, Agay D. Toxic effects of iterative intraperitoneal administration of zinc gluconate in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008;103:267-72.
- [25] Peinnequin A, Mouret C, Birot O, Alonso A, Mathieu J, Clarencon D, Agay D, Chancerelle Y, Multon E. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol.* 2004;5:3.
- [26] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25:402-8.
- [27] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3:RESEARCH0034.
- [28] Arnaud J, Bellanger J, Bienvenu F, Chappuis P, Favier A. Recommended method for assaying serum zinc with flame atomic absorption. *Ann Biol Clin.* 1986;44:77-87.
- [29] Agay D, Spadoni S, Almeras D, Galois-Guibal L, Touvard L, Chancerelle Y. Enquête relative à la supplémentation en vitamines et en éléments traces dans les centres de traitements des brûlés. *Brûlures.* 2007;VIII:127-133.
- [30] Ding HQ, Zhou BJ, Liu L, Cheng S. Oxidative stress and metallothionein expression in the liver of rats with severe thermal injury. *Burns.* 2002;28:215-21.

- [31] Qin F, Chen X, Ding H, Cheng S, Sun Y. [Protective effects of Zn-metallothionein on erythrocyte membrane of rats with severe scalding after delayed resuscitation]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2002;40:222-4.
- [32] Chen X, Qin F, Cheng S. [The protective effects of Zn-metallothionein on severely scalded rats inflicted by oxygen free radicals]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 2001;17:46-8.
- [33] Kondoh M, Inoue Y, Atagi S, Futakawa N, Higashimoto M, Sato M. Specific induction of metallothionein synthesis by mitochondrial oxidative stress. *Life Sci*. 2001;69:2137-46.
- [34] Sato M, Sasaki M, Hojo H. Antioxidative roles of metallothionein and manganese superoxide dismutase induced by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6. *Arch Biochem Biophys*. 1995;316:738-44.
- [35] Cherian MG, Chan HM. Biological function of metallothionein: a review. In: Suzuki KT, Imura N, Kimura M, eds. *Metallothionein III: Biological roles and medical implications*. Berlin: Birkhauser, 1993:87-109.
- [36] Palmiter RD, Findley SD. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *Embo J*. 1995;14:639-49.
- [37] Aguilar-Alonso P, Martinez-Fong D, Pazos-Salazar NG, Brambila E, Gonzalez-Barrios JA, Mejorada A, Flores G, Millan-Perezpena L, Rubio H, Leon-Chavez BA. The increase in zinc levels and upregulation of zinc transporters are mediated by nitric oxide in the cerebral cortex after transient ischemia in the rat. *Brain Res*. 2008;1200:89-98.
- [38] Tsuda M, Imaizumi K, Katayama T, Kitagawa K, Wanaka A, Tohyama M, Takagi T. Expression of zinc transporter gene, ZnT-1, is induced after transient forebrain ischemia in the gerbil. *J Neurosci*. 1997;17:6678-84.
- [39] Peters JL, Dufner-Beattie J, Xu W, Geiser J, Lahner B, Salt DE, Andrews GK. Targeting of the mouse Slc39a2 (Zip2) gene reveals highly cell-specific patterns of expression, and unique functions in zinc, iron, and calcium homeostasis. *Genesis*. 2007;45:339-52.

- [40] Xu TF, Wang XL, Yang JZ, Hu XY, Wu WF, Guo L, Kang LD, Zhang LY. Overexpression of Zip-2 mRNA in the leukocytes of asthmatic infants. *Pediatr Pulmonol.* 2009;44:763-7.
- [41] Desouki MM, Geradts J, Milon B, Franklin RB, Costello LC. hZip2 and hZip3 zinc transporters are down regulated in human prostate adenocarcinomatous glands. *Mol Cancer.* 2007;6:37.

**Legends for illustrations**

**Table 1.** Forward (FW) and reverse (RW) primer sequences used for quantitative PCR assays

**Figure 1.** Evolution of zinc levels in plasma of untreated and Zn supplemented rats after a 20% TBSA burn.

**Figure 2.** Evolution of zinc levels in liver of untreated and Zn supplemented rats after a 20% TBSA burn.

**Figure 3.** Relative quantity of MT-IA mRNAs in liver of untreated and Zn supplemented rats after a 20% TBSA burn.

**Figure 4.** Relative quantity of ZnT-1 mRNAs in liver of untreated and Zn supplemented rats after a 20% TBSA burn.

**Figure 5.** Relative quantity of ZnT-4 mRNAs in liver of untreated and Zn supplemented rats after a 20% TBSA burn.

**Figure 6.** Relative quantity of Zip2 mRNAs in liver of untreated and Zn supplemented rats after a 20% TBSA burn.

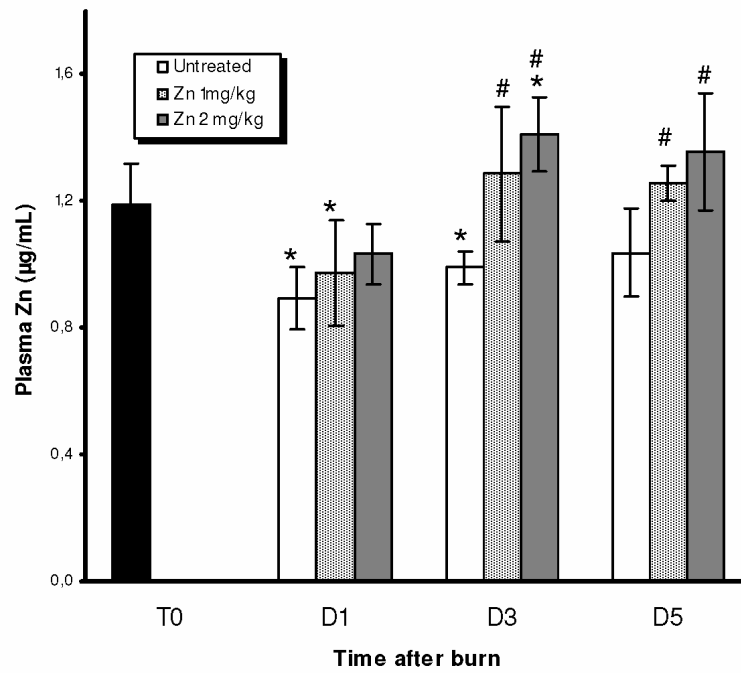
**Figure 7.** Relative quantity of Zip4 mRNAs in liver of untreated and Zn supplemented rats after a 20% TBSA burn.

**Table 1.** Forward (FW) and reverse (RW) primer sequences used for quantitative PCR assays

Gene	Genbank accession number	5'-3' primer sequence	Product size (base pairs)	Annealing temperature (°C)
ZnT-1	NM_022853	FW GACCAACACGCTAGTGGCTAACA	122	56
		RW CTGGATGAGATTCCCATTTACCT		
ZnT-4	NM_172066	FW GGGGGATTGGTACAAAGTGTG	91	55
		RW CGTACAGATGGGGTCAGCAATC		
Zip2	NM_1107260	FW GCTTGCCCTCCTGGTTTCAC	96	55
		RW ACCCTGTGGTGGTACCTGTTG		
Zip4	NM_1077669	FW AGGAGGGCGAGACTTGGATTC	78	55
		RWTGGCTGGGAGCATGTCACAG		
MT-1A	NM_138826	FW GCTTACACCGTTGCTCCAGATTC	120	58
		RW GGAGGTGCATTTGCAGTCTTG		
GAPDH	NM_017008	FW CCAATGTATCCGTTGTGGATCTGAC	78	57
		RW GCTTACCACCTTCTTGATGTCATC		
HPRT	NM_012583	FW TCATGGACTGATTATGGACAGGAC	123	60
		RW GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC		
CycA	NM_017101	FW GGCAAATGCTGGACCAAACAC	94	57
		RW CTTCCAAAGACCACATGCTTG		
ARBP	NM_022402	FW CCTGCACACTCGTTCCTAGAG	74	57
		RW CAACAGTCGGGTAGCCAATCTG		



**Figure 1.** Evolution of zinc levels in plasma of untreated and Zn supplemented rats after a 20% TBSA burn.

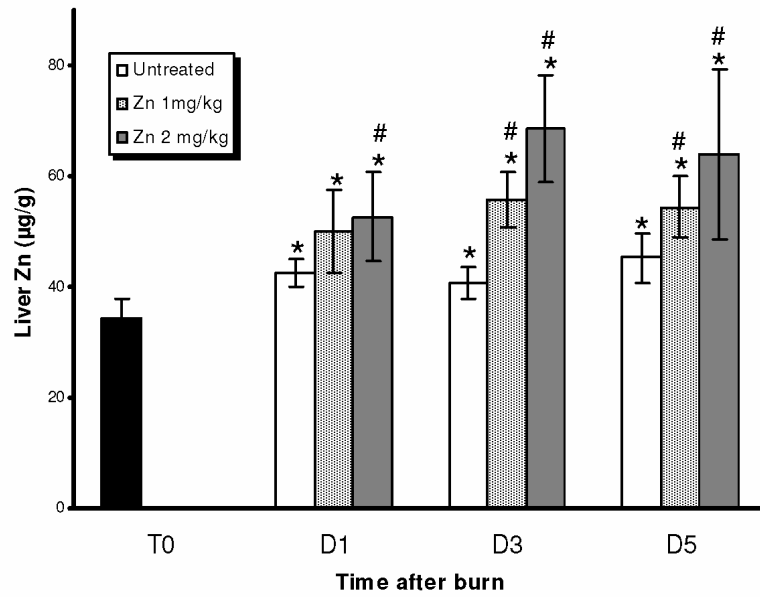


Data are presented as means  $\pm$  SD (n=5).

\*  $p < 0.05$  : comparison to the initial values (T0).

#  $p < 0.05$  : comparison of Zn treated series to untreated series, on the same day.

**Figure 2.** Evolution of zinc levels in liver of untreated and Zn supplemented rats after a 20% TBSA burn.

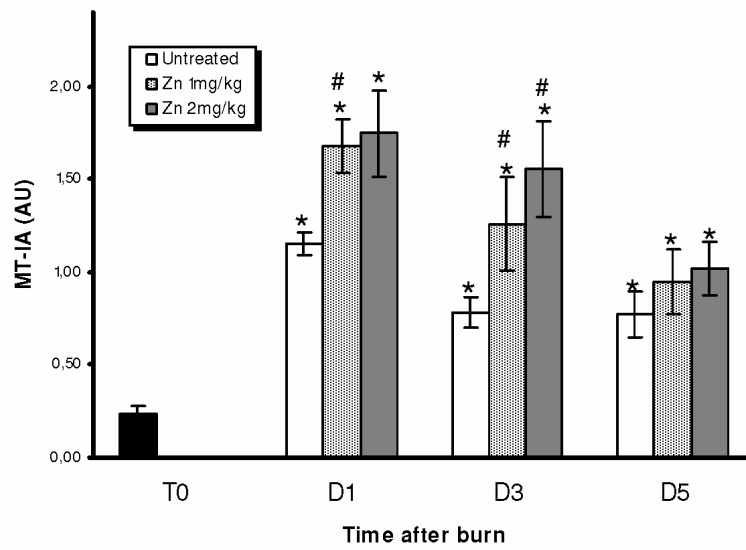


Data are presented as means  $\pm$  SD (n=5) and are expressed on a wet weight basis.

\*  $p < 0.05$  : comparison to the initial values (T0).

#  $p < 0.05$  : comparison of Zn treated series to untreated series, on the same day.

**Figure 3.** Relative quantity of MT-IA mRNAs in liver of untreated and Zn supplemented rats after a 20% TBSA burn.

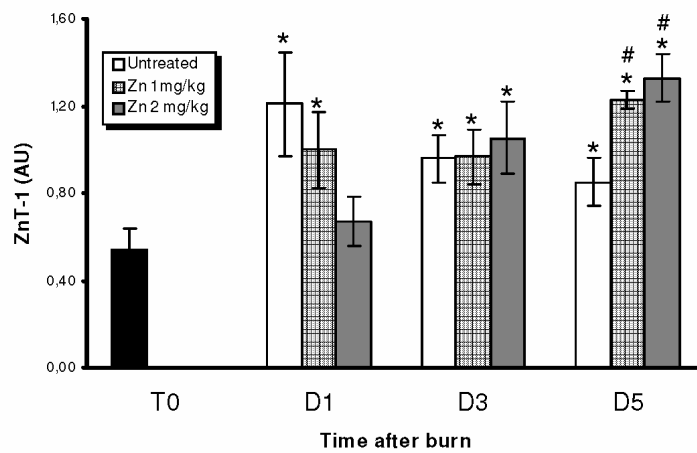


Data are presented as means ( $n = 5$ )  $\pm$  S.E.M. and are expressed, in arbitrary units (AU).

\*  $p < 0.05$  : comparison to initial values (T0).

#  $p < 0.05$  : comparison of Zn treated series to untreated series, on the same day.

**Figure 4.** Relative quantity of ZnT-1 mRNAs in liver of untreated and Zn supplemented rats after a 20% TBSA burn.

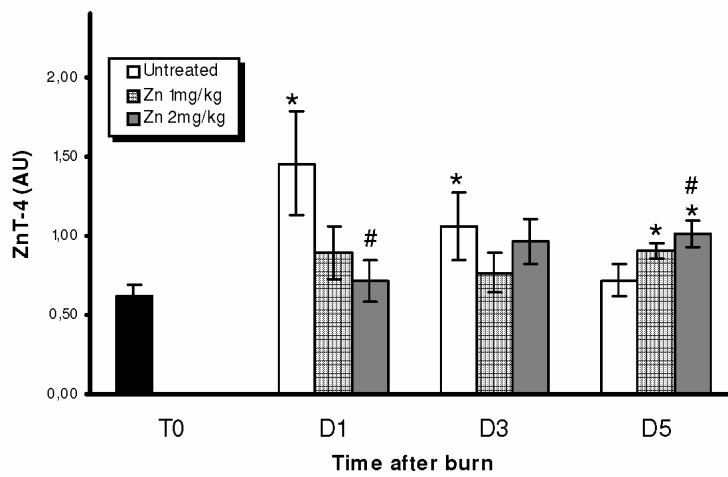


Data are presented as means ( $n = 5$ )  $\pm$  S.E.M. and are expressed, in arbitrary units (AU).

\*  $p < 0.05$  : comparison to initial values (T0).

#  $p < 0.05$  : comparison of Zn treated series to untreated series, on the same day.

**Figure 5.** Relative quantity of ZnT-4 mRNAs in liver of untreated and Zn supplemented rats after a 20% TBSA burn.

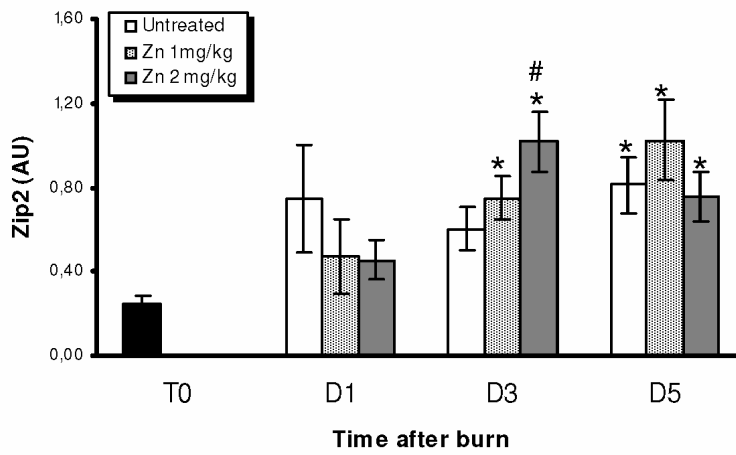


Data are presented as means ( $n = 5$ )  $\pm$  S.E.M. and are expressed, in arbitrary units (AU).

\*  $p < 0.05$  : comparison to initial values (T0).

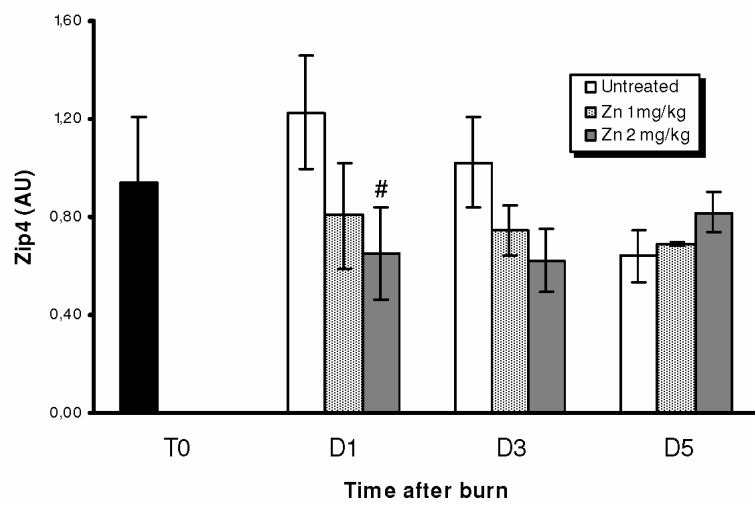
#  $p < 0.05$  : comparison of Zn treated series to untreated series, on the same day.

**Figure 6.** Relative quantity of Zip2 mRNAs in liver of untreated and Zn supplemented rats after a 20% TBSA burn.



Data are presented as means ( $n = 5$ )  $\pm$  S.E.M. and are expressed, in arbitrary units (AU).  
\*  $p < 0.05$  : comparison to initial values (T0).  
#  $p < 0.05$  : comparison of Zn treated series to untreated series, on the same day.

**Figure 7.** Relative quantity of Zip4 mRNAs in liver of untreated and Zn supplemented rats after a 20% TBSA burn.



Data are presented as means ( $n = 5$ )  $\pm$  S.E.M. and are expressed, in arbitrary units (AU).

\*  $p < 0.05$  : comparison to initial values (T0).

#  $p < 0.05$  : comparison of Zn treated series to untreated series, on the same day.

# **Discussion - Perspectives**





## Contexte de la thèse et questions posées

Lors d'une agression thermique, les mécanismes cellulaires sont très précocément perturbés. La prise en charge précoce des grands brûlés doit prendre en compte ces altérations cellulaires, notamment les aspects liés au développement du stress oxydant induit dans l'organisme après la brûlure, ainsi que les aspects liés à la mise en place de la réaction inflammatoire.

Dès les premières heures suivant l'agression thermique, l'inflammation induit la production de molécules réactives, les radicaux libres, nécessaires pour lutter contre les bactéries. Ces marqueurs du stress oxydant sont libérés en grande quantité dans l'organisme, induisant immédiatement la mise en jeu de l'ensemble des systèmes antioxydants. Dans les cas les plus graves de brûlure étendues et profondes, les systèmes enzymatiques antioxydants de l'organisme apparaissent rapidement saturés, alors que les besoins en Se et zinc, éléments-trace antioxydants nécessaires à leurs sites actifs sont largement accrus du fait de pertes importantes par voies transcutanée et urinaire. Compte tenu de leurs rôles antioxydant, anti-inflammatoire, et anti-infectieux, les apports et le statut en éléments-trace comme le zinc et le sélénium méritent donc une attention particulière chez le patient sévèrement brûlé.

Paradoxalement, l'apport de micronutriments dont le zinc et le sélénium, en routine chez les grands brûlés, n'est pas uniformisé dans les différents centres de traitements.

Dans notre groupe, l'intérêt et les limites d'une supplémentation isolée, précoce et massive en sélénium ayant fait l'objet de plusieurs publications, il nous a semblé important d'étudier, après le sélénium, les altérations du statut en zinc dès les premières heures suivant la brûlure, sa relation avec certains marqueurs du stress oxydant et du système glucose/insuline et l'impact de la supplémentation en cet élément-trace. Cette approche biochimique réalisée dans la première partie de notre travail, nous avons voulu explorer les changements de l'homéostasie du zinc qui interviennent après l'agression thermique en étudiant les modifications des transporteurs du zinc.

## Limites de notre recherche

### Avantages et limites du modèle animal

Les études sur modèles animaux offrent de nombreux avantages : alors que des études cliniques sont réalisées chez des patients différents en âge, sexe, poids, régime alimentaire et gravité de la brûlure, le modèle animal permet d'étudier une population homogène et de choisir l'intensité de l'agression thermique. En outre, il n'est pas possible d'imposer de trop nombreux prélèvements sanguins chez les grands brûlés déjà très éprouvés, ni de les soumettre à des biopsies tissulaires. Au contraire, le modèle animal permet de multiplier les prélèvements, d'accéder aux paramètres tissulaires et d'obtenir ainsi des informations non accessibles chez les patients. De plus, sur modèle animal, il est possible de suivre l'évolution de la pathologie et des paramètres biologiques en s'abstenant de compenser les pertes par des apports quotidiens, et ce dans le respect le plus absolu des règles d'éthique.

Cependant l'extrapolation à l'Homme des résultats reste délicate compte tenu des différences d'espèces, de métabolisme ou de physiologie, et nos résultats doivent être considérés avec prudence, en particulier en ce qui concerne les réponses à la supplémentation car les besoins et les apports chez l'Homme et chez le rat peuvent difficilement être comparés. La voie d'administration et la dose administrée sont aussi des limites à l'extrapolation des résultats.

### Choix du régime

Les modifications induites par une carence profonde aurait été peut-être plus significatives mais sans que cela ne reflète la situation nutritionnelle probable du patient. Premièrement, dans les pays occidentaux, les déficits modérés d'apports en micronutriments sont fréquents et, parmi ceux-ci, les déficits d'apports en zinc sont très souvent rencontrés. Par conséquent, il y a donc une grande probabilité pour que nos patients subissent le stress induit par la brûlure alors que leurs apports avant l'accident n'étaient pas optimaux. Or, une subdéficience en zinc préalable à la brûlure apparaît comme un facteur d'aggravation et de complications chez le patient brûlé. Deuxièmement, l'évolution de la physiopathologie cutanée induite par la brûlure suit deux voies bien distinctes chez l'Homme et le rat. Alors que, chez l'Homme, les plaies sont exsudatives, chez le rat, les plaies restent « sèches ». Par conséquent, afin de mimer les pertes exsudatives de l'Homme, il fallait carencer au préalable les animaux.

Les animaux, dont les apports en zinc sont expérimentalement limités, ne présentent pas les signes bien connus d'une carence sévère en zinc. La perte de poids reste non significative par rapport aux animaux normo-nutris ; la dépilation et les lésions cutanées restent très modérées ; l'inflammation ainsi que la perturbation du métabolisme du cuivre due à l'interaction

zinc/cuivre, suivies par l'évolution du statut de cet élément-trace, sont absentes. Par conséquent, les différences observées, à la suite de nos expériences, entre les animaux subdéficients et les animaux normaux, sont dues uniquement au statut déficitaire en zinc et non à une inflammation, à une croissance ralentie ou à un apport calorique diminué. La carence peut-elle donc être considérée comme suffisante ? Au vu de la modification induite par la subdéficiência sur le statut zincique des différents organes et sur certains marqueurs du stress oxydant, la réponse est positive. En effet, la subcarence entraîne une perte significative des réserves osseuses en zinc et des réserves de glutathion réduit ainsi qu'une augmentation des TBARs hépatiques et plasmatiques.

### **Pertinence des biomarqueurs**

Nous devons nous poser la question de l'utilisation de marqueurs pertinents du stress oxydatif. Nous avons utilisé des biomarqueurs de stress oxydant validés mais peu spécifiques, en particulier les TBARs. D'autres marqueurs du stress oxydant (mesure des dommages oxydatifs à l'ADN par la méthode des comètes, isoprostanes...) auraient pu donner des indications plus spécifiques. Cependant, compte tenu de la logistique déjà très lourde de nos protocoles et de leur coût, il nous était impossible de réaliser de telles mesures.

### **Limite de l'étude préliminaire de toxicité**

La question de la supplémentation nécessaire pour lutter contre les effets du choc thermique s'est posée. Cependant, une supplémentation ne doit pas être considérée comme un geste anodin surtout lorsqu'il s'agit de composés tels que les éléments-trace dont les limites de sécurité, en particulier par voie parentérale sont mal connues. En effet, un apport de zinc très supérieur aux apports journaliers recommandés peut entraîner des perturbations métaboliques en induisant des réactions antagonistes qui peuvent mener, par compétition, au déficit en d'autres nutriments ainsi qu'à d'autres effets indésirables comme l'immunosuppression par exemple. Un tel effet dans un organisme sain pourrait être exacerbé dans un organisme blessé. C'est pourquoi, il était nécessaire de contrôler la toxicité d'un apport en zinc, par injections intrapéritonéales, sur notre modèle animal. Ce mode d'administration est certes éloigné de ce qui est utilisé chez l'Homme, mais représente une alternative séduisante quant à la mise en oeuvre chez le rat. La supplémentation intrapéritonéale est proche d'une nutrition parentérale, voie majoritairement utilisée lors des apports de micronutriments.

## Principaux résultats

### Impact d'une sub-déficience en zinc sur le stress oxydant après brûlure

Nos résultats sont en accord avec de précédentes études en montrant une variation du statut en zinc après la brûlure : diminution du zinc plasmatique et augmentation du zinc hépatique. Le déficit en zinc altère les flux de zinc inter-organes. En effet, chez l'animal subdéficient en zinc, la chute plasmatique est renforcée, après la brûlure, et l'augmentation hépatique plus modérée. Ceci suggère l'absence de zinc mobilisable, en particulier le zinc osseux, déjà mobilisé avant brûlure chez l'animal déficitaire en zinc.

Une subdéficience en zinc provoque, chez le rat sain, une augmentation des marqueurs de stress oxydant sans, cependant, affecter les enzymes antioxydantes. Par conséquent, même si les apports de zinc modulent la réponse de l'organisme face à une agression thermique, un statut déficitaire ne semble pas être, pour l'instant, un élément aggravant majeur à prendre en compte vis-à-vis des dommages induits par une brûlure, contrairement à ce que nous avons observé pour le sélénium.

### Statut en zinc et insulino-sensibilité

L'hyperglycémie, l'intolérance au glucose et des niveaux d'insuline élevés sont fréquemment observés chez les patients brûlés. Nos expériences menées chez le rat montrent bien qu'une agression thermique entraîne une augmentation rapide de la glycémie liée à une baisse de la sensibilité à l'insuline. Cependant, les mécanismes de cette insulino-résistance restent incomplètement expliqués. Est fréquemment évoquée une altération de la propagation du signal post-récepteur de l'insuline et/ou une diminution de la sécrétion de l'insuline. Nous savons qu'une relation physico-chimique étroite existe entre le zinc et l'insuline. En effet, le zinc intervient dans la synthèse, le stockage et la sécrétion de l'insuline. De plus, le zinc est un régulateur important de la Protein Tyrosin Phosphatase 1B, enzyme clé de la déphosphorylation du récepteur de l'insuline. Or, nous avons montré, chez les animaux déficients en zinc, une insulino-résistance accentuée. Par conséquent, il pourrait exister un intérêt majeur à restaurer et à contrôler le statut en zinc après une brûlure étendue afin de limiter les effets délétères de l'insulino-résistance.

### Intérêt de la supplémentation en zinc

Il est indéniable que les apports en zinc ont modifié considérablement le statut en zinc chez les animaux brûlés. Dans tous les tissus analysés, une rétention du zinc est observée. Dans le compartiment sanguin, les apports en zinc permettent de compenser les pertes observées chez les brûlés. Pour le foie, le rein et l'intestin, l'accumulation de zinc s'effectue au-delà du statut

initial. Un tel effet pourrait provoquer des effets secondaires indésirables. Cependant, l'étude d'indicateurs biochimiques ne met pas en évidence un dysfonctionnement métabolique. A l'opposé, les apports en zinc ne réussissent pas à limiter le stress oxydant chez les animaux brûlés et ne modifient pas l'activité des enzymes antioxydantes SOD et GPx. Par conséquent, malgré les propriétés antioxydantes démontrées du zinc, ces résultats rappellent à l'évidence que les autres antioxydants (sélénium, vitamines C et E, caroténoïdes...) doivent simultanément être pris en considération.

### **Etude des mouvements hépatiques du zinc**

Notre étude ouvre la voie à une investigation future puisque la brûlure et la supplémentation en zinc mènent à une modification non négligeable de ces éléments. En effet, l'augmentation de la synthèse hépatique de la métallothionéine, consécutive à la brûlure, confirme les résultats de la littérature. Cette surexpression permet d'accroître le transfert du zinc vers le foie. L'élévation combinée du zinc et de la métallothionéine protège le foie, de manière directe et indirecte, contre les attaques radicalaires. Le zinc participe également à la synthèse des protéines de la phase aiguë. La supplémentation en zinc, en amplifiant la surexpression de la métallothionéine, peut être considérée comme une action bénéfique. L'étude des transporteurs du zinc est plus difficilement interprétable. En effet, leurs niveaux d'expression ne sont pas corrélés à teneur hépatique en zinc. Cependant, l'ensemble des transporteurs du zinc n'a pas été étudié et, par conséquent, des études complémentaires sont indispensables pour conclure quant à la régulation du zinc hépatique, à la suite d'une brûlure et/ou d'une supplémentation en zinc.

## Conclusions et Perspectives

Cette série d'expérience a permis, pour la première fois à notre connaissance, d'approfondir l'influence des apports et du statut en zinc dans les modifications métaboliques induites par la brûlure. Contrairement au déficit en sélénium, le déficit en zinc ne semble pas être un facteur d'aggravation du stress oxydant au cours de l'agression thermique. Ce déficit apparaît, en revanche, impliqué dans l'insulino-résistance développée après brûlure. L'homéostasie du zinc est perturbée comme en témoignent les modifications de l'expression de ses transporteurs au niveau hépatique. Le zinc reste au cœur de fonctions essentielles comme la fonction insulinique, la fonction immunitaire, la fonction antioxydante mais des études complémentaires sont nécessaires pour proposer un protocole consensuel de supplémentation en zinc chez le patient brûlé. Les résultats obtenus en biologie moléculaire sont novateurs, ils soulignent la complexité du métabolisme du zinc et les limites potentielles des supplémentations.

La synergie d'action entre le zinc et le sélénium est bien décrite. Les perspectives ouvertes par ce travail nous conduisent à envisager un protocole d'étude associant le zinc et le sélénium pour progresser dans notre objectif d'amélioration du cocktail thérapeutique d'éléments-trace destiné à la prise en charge précoce des grands brûlés.

# **Annexes**





<b>Annexe I : Expérimentation animale.....</b>	<b>237</b>
L'animal _____	237
Modèle expérimental de la brûlure thermique chez le rat _____	237
<b>Annexe II : Prélèvements des échantillons.....</b>	<b>239</b>
Prélèvements sanguins _____	239
Prélèvement sur Héparinate de Lithium _____	239
Prélèvements sur EDTA _____	239
Prélèvements des organes _____	240
<b>Annexe III : Homogénéisation des organes .....</b>	<b>242</b>
En vue du dosage des enzymes anti-oxydantes, des TBARs et des protéines ____	242
En vue de la PCR quantitative en temps réel _____	243
<b>Annexe IV : Détermination des paramètres .....</b>	<b>244</b>
Détermination des enzymes antioxydantes _____	244
Dosage de la catalase (CAT) _____	244
Dosage de la glutathion peroxidase (GPx) _____	245
Dosage de la superoxyde dismutase (SOD) _____	245
Détermination des paramètres antioxydants _____	246
Dosage des espèces réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARs) _____	246
Dosage des groupements thiols (SH) _____	247
Dosage du glutathion total (GSH) et du glutathion oxydé (GSSG) _____	248
Dosage du statut antioxydant total (TAS) _____	250
Détermination des paramètres biochimiques du sang _____	251
Dosage de la glycémie _____	251
Dosage du cholestérol _____	251
Dosage de l'albumine _____	251
Dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT) _____	251
Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT) _____	252
Dosage de la phosphatase alcaline (PAL) _____	252
Dosage de la créatinine _____	252
Dosage de l'urée _____	252
Dosage de la créatine kinase _____	253
Dosage du lactate déshydrogénase _____	253
Détermination de la numération sanguine _____	253
Détermination des protéines totales _____	253
Détermination du taux d'Hémoglobine _____	253

Endocrinologie _____	254
Détermination de la corticostérone _____	254
Détermination de l'insuline, de la leptine et du glucagon _____	254
<b>Annexe V : Dosage du zinc et du cuivre plasmatique et tissulaire par spectrométrie d'absorption atomique en flamme (SAAF) ou électrothermique (SAAE) .....</b>	<b>255</b>
Principe de la spectrométrie d'absorption (SAA) _____	255
Réalisation des dosages _____	257
<b>Annexe VII : Procédures de dosages des ARNm par RT-PCR en temps réel .....</b>	<b>259</b>
Extraction des ARN messagers _____	259
Transcription inverse des ARN messagers _____	260
PCR quantitative en temps réel _____	260
Dessin des amorces _____	260
Réaction de polymérisation en chaîne _____	262
Analyse des résultats _____	263

# 1. Annexe I : Expérimentation animale

## 1.1. L'animal

Les animaux utilisés sont des rats Wistar mâles, âgés de 3 semaines, d'un poids initial d'environ 75g, exempts de germes pathogènes, hébergés par le service de Biologie Appliquée du CRSSA. Les animaux sont maintenus, un par cage, dans les conditions zootechniques imposées par les textes réglementaires français et communautaires. Les locaux sont en légère surpression, les cages, les litières, les biberons et l'eau de boisson sont stérilisés pour limiter le risque infectieux. Les expérimentateurs sont tenus de ne pénétrer dans l'enceinte qu'après avoir revêtu une blouse, des gants, un masque et des surbottes. Les litières sont changées deux fois par semaine et les animaux reçoivent nourriture et boisson *ad libitum*. L'ensemble du protocole a reçu l'aval du comité d'éthique d'expérimentation animale du CRSSA et les expérimentateurs, titulaires de l'autorisation de pratiquer l'expérimentation animale, se sont engagés à respecter les règles déontologiques applicables à ce domaine.

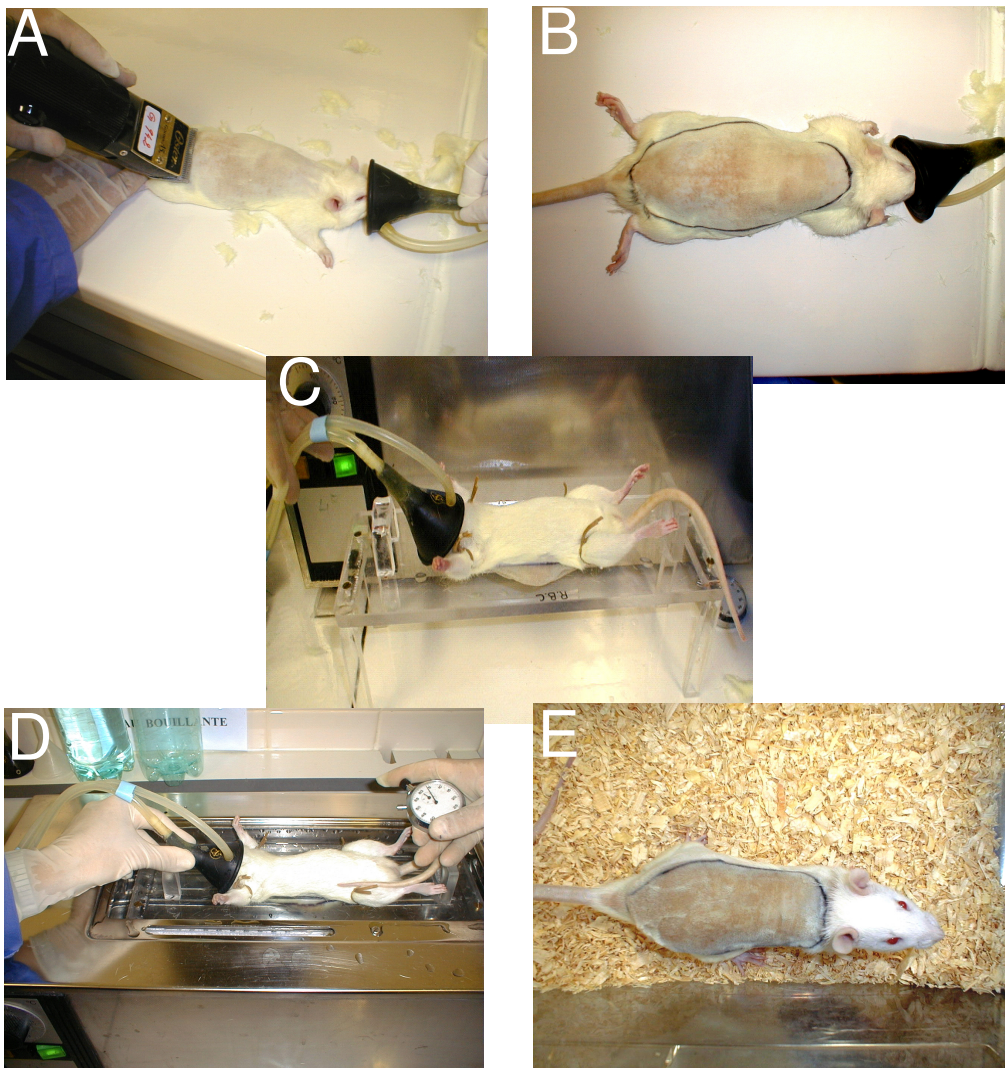
## 1.2. Modèle expérimental de la brûlure thermique chez le rat

Une brûlure du 3<sup>e</sup> degré, affectant 20% de la surface corporelle, est réalisée selon la technique décrite par Walker et Mason (*Walker, 1968*). La surface corporelle à brûler est calculée à l'aide de la formule :

$$\boxed{\text{Surface corporelle totale (cm}^2\text{)} = K \times \text{Poids}^{2/3} \text{ (g)}} \quad K = 20 \text{ chez le rat}$$

Cette surface est matérialisée par une ellipse dessinée sur un film plastique souple qui est ensuite découpé. Les animaux sont anesthésiés par inhalation d'halothane. Le film est appliqué sur la peau rasée du dos et la surface à brûler est délimitée en dessinant avec un marqueur le contour de l'ellipse évidée (**figure 43A et 43B**). L'animal, toujours sous anesthésie, est placé sur le dos sur une plaque en plexiglas de 1 cm d'épaisseur présentant en son centre un évidement rectangulaire de 8x3 cm. Alors que des bracelets de caoutchouc retiennent les pattes de l'animal, la peau du dos est tirée à travers le rectangle évidé suivant le contour dessiné à l'aide de l'ellipse (**figure 43C**). La plaque portant le rat est immergée dans un bain-marie de façon à ce que seule la peau dépassant sous la plaque soit immergée dans l'eau à 90°C durant 10 sec (**figure 43D**). La plaque de plexiglas, du fait de son épaisseur, isole totalement de la chaleur le reste du corps de l'animal. La peau brûlée est soigneusement séchée et l'anesthésie stoppée. La peau brûlée est brunâtre et cartonnée (**figure 43E**), elle s'épaissit et durcit encore avec le temps. Les brûlures du 3<sup>e</sup> degré détruisent les terminaisons nerveuses de la peau et, de ce fait, ne sont pas douloureuses. Les animaux brûlés ne présentent pas de troubles de la mobilité ni de perturbation dans l'alimentation ou la prise de boissons.

Le groupe d'animaux témoins est constitué de rats normaux seulement anesthésiés et rasés.



**Figure 43 : Modèle expérimental de la brûlure chez le rat. A. Tonte de l'animal ; B. Délimitation de la surface corporelle à brûler ; C. Positionnement de l'animal en décubitus dorsal sur la plaque en plexiglas ; D. Induction de la brûlure (10s à 100°C) ; E. Réveil de l'animal et aspect de la peau brûlée.**

## 2. Annexe II : Prélèvements des échantillons

### 2.1. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins ont été effectués à l'aide de seringues S-Monovette™ (Sarstedt, Germany) (Tableau X).

#### 2.1.1. Prélèvement sur Héparinate de Lithium

Tableau X : Prélèvements sanguins (type - quantité - post-traitement)

Analyse sur sang total				
Type d'analyse	Quantité	Contenant	Traitement post prélèvement	Stockage
<i>Glutathion – Glutathion oxydé</i>	100 µL	Eppendorf (1.5 mL)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ajout de 900 µL d'acide métaphosphorique (MPA) à 6 %</li> <li>Centrifuger (10 min, 3000g, 4°C)</li> <li>Récupérer le surnageant</li> </ul>	- 80°C
<i>Glutathion Peroxydase</i>	25 µL	Eppendorf	Ajout de 1 mL de diluant RANSEL™	

Analyse sur plasma Centrifuger le sang total (10 min, 3000g, 4°C)				
Type d'analyse	Quantité	Contenant	Traitement post prélèvement	Stockage
<i>Biochimie du sang</i>	230 µL	Eppendorf (1.5 mL)		- 80°C
<i>Eléments – trace (Zn et Cu)</i>	500 µL	Eppendorf « oligo-free »		
<i>TBARs</i>	230 µL	Eppendorf		
<i>Groupements thiols</i>	230 µL	Eppendorf		
<i>Statut antioxydant total</i>	150 µL	Eppendorf		
<i>Corticostérone</i>	150 µL	Eppendorf		

Analyse sur globules rouges Centrifuger le sang total (10 min, 3000g, 4°C)				
Type d'analyse	Quantité	Contenant	Traitement post prélèvement	Stockage
<i>Eléments – trace (Zn et Cu)</i>	200 µL	Eppendorf (1.5 mL)	Dilution au ¼ (600 µL) avec du tampon de lyse (Tris-HCl, 5 mM, pH 7.4)	- 80°C
<i>Catalase</i>	200 µL	Eppendorf	<ul style="list-style-type: none"> <li>Laver 3 fois les globules rouges avec du chlorure de sodium 0.9 %</li> <li>Prélever 100 µL de culot globulaire</li> <li>Diluer au 1/10 avec du tampon de lyse (Tris-HCl, 5 mM, pH 7.4)</li> </ul>	
<i>Superoxyde dismutase</i>	250 µL	Eppendorf	<ul style="list-style-type: none"> <li>Laver 3 fois les globules rouges avec du chlorure de sodium 0.9 %</li> <li>Qsp 1 mL d'eau froide</li> </ul>	

## 2.1.2. Prélèvements sur EDTA

Analyse sur sang total		
Type d'analyse	Quantité	Traitement post prélèvement
<i>Numération sanguine</i>	300 µL	Analyse immédiate sur automate Pentra 120 (ABX Horiba ; Montpellier ; France)

Analyse sur plasma Centrifuger le sang total (10 min, 3000g, 4°C)			
Type d'analyse	Quantité	Contenant	Stockage
<i>Endocrinologie (Insuline, Leptine, Glucagon)</i>	45 µL	Eppendorf	- 80°C

## 2.2. Prélèvements des organes

Tableau XI : Prélèvements tissulaires (quantité - stockage)

FOIE			
Type d'analyse	Quantité	Contenant	Stockage
<i>Eléments – trace</i>	300 mg	Tube conique oligo-free de 15 mL	Azote liquide Puis - 80°C
<i>Stress oxydant (SOD, GPx, Catalase, TBARs)</i>	400 mg	Eppendorf	
<i>Echantillon “Sécurité”</i>	500 mg	Sachet plastique zippé	
<i>Biologie Moléculaire</i>	300 mg	Cryotube + RNA Later™ (1.5 mL)	4°C pendant 24h puis -80°C

FEMUR			
Type d'analyse	Quantité	Contenant	Stockage
<i>Eléments – trace</i>	Entier (nettoyer puis peser)	Tube conique oligo-free de 15 mL	Azote liquide Puis - 80°C

REIN			
Type d'analyse	Quantité	Contenant	Stockage
<i>Eléments – trace</i>	½ Rein	Tube conique oligo-free de 15 mL	Azote liquide Puis - 80°C
<i>Stress oxydant (SOD, GPx, Catalase, TBARs)</i>	½ Rein	Eppendorf	
<i>Echantillon “Sécurité”</i>	½ Rein	Sachet plastique zippé	
<i>Biologie Moléculaire</i>	½ Rein	Cryotube + RNA Later™ (1.5 mL)	4°C pendant 24h puis -80°C

INTESTIN			
Type d'analyse	Quantité	Contenant	Stockage
<i>Eléments – trace</i>	300 mg	Tube conique oligo-free de 15 mL	Azote liquide Puis - 80°C
<i>Echantillon “Sécurité”</i>	500 mg	Sachet plastique zippé	

MUSCLE			
Type d'analyse	Quantité	Contenant	Stockage
<i>Eléments – trace</i>	300 mg	Tube conique oligo-free de 15 mL	Azote liquide Puis - 80°C
<i>Stress oxydant (SOD, GPx, Catalase, TBARs)</i>	400 mg	Eppendorf	
<i>Echantillon “Sécurité”</i>	500 mg	Sachet plastique zippé	
<i>Biologie Moléculaire</i>	100 mg	Cryotube + RNA Later™ (0.5 mL)	4°C pendant 24h puis -80°C



### 3. Annexe III : Homogénéisation des organes

#### 3.1. En vue du dosage des enzymes anti-oxydantes, des TBARs et des protéines

- **Réactifs**

- Phenylmethanesulfonyl Fluoride (PMSF) 100 mmol.L<sup>-1</sup> (0.1742 g qsp 10 mL d'isopropanol)

**Tampon de lyse (préparation extemporanée) :**

- Tris[hydroxyméthyl]aminométhane (TrizmaBase) 10 mmol.L<sup>-1</sup> (0.24228 g)  
- Acide Diéthylènetriaminepentaacétique (DTPA) 1 mmol.L<sup>-1</sup> (0.07866 g)  
- Phenylmethanesulfonyl Fluoride (PMSF) 1 mmol.L<sup>-1</sup> 2 mL de la solution mère à 100 mmol.L<sup>-1</sup>  
- Eau distillée qsp 200 mL

- **Broyage**

Le broyage des organes est effectué à l'aide d'un potter de Thomas. Ce broyeur est composé d'un cylindre à réservoir en verre borosilicaté et d'un piston en Téflon à embout rond strié sur une tige en acier inoxydable. La tige est reliée à un agitateur réglé sur une vitesse de rotation constante de 1200 tr.min<sup>-1</sup>.

Les organes sont broyés à la concentration de 100 mg d'organe / mL de tampon de lyse. Le processus de broyage est résumé dans la figure ci-dessous (**Figure 44**).

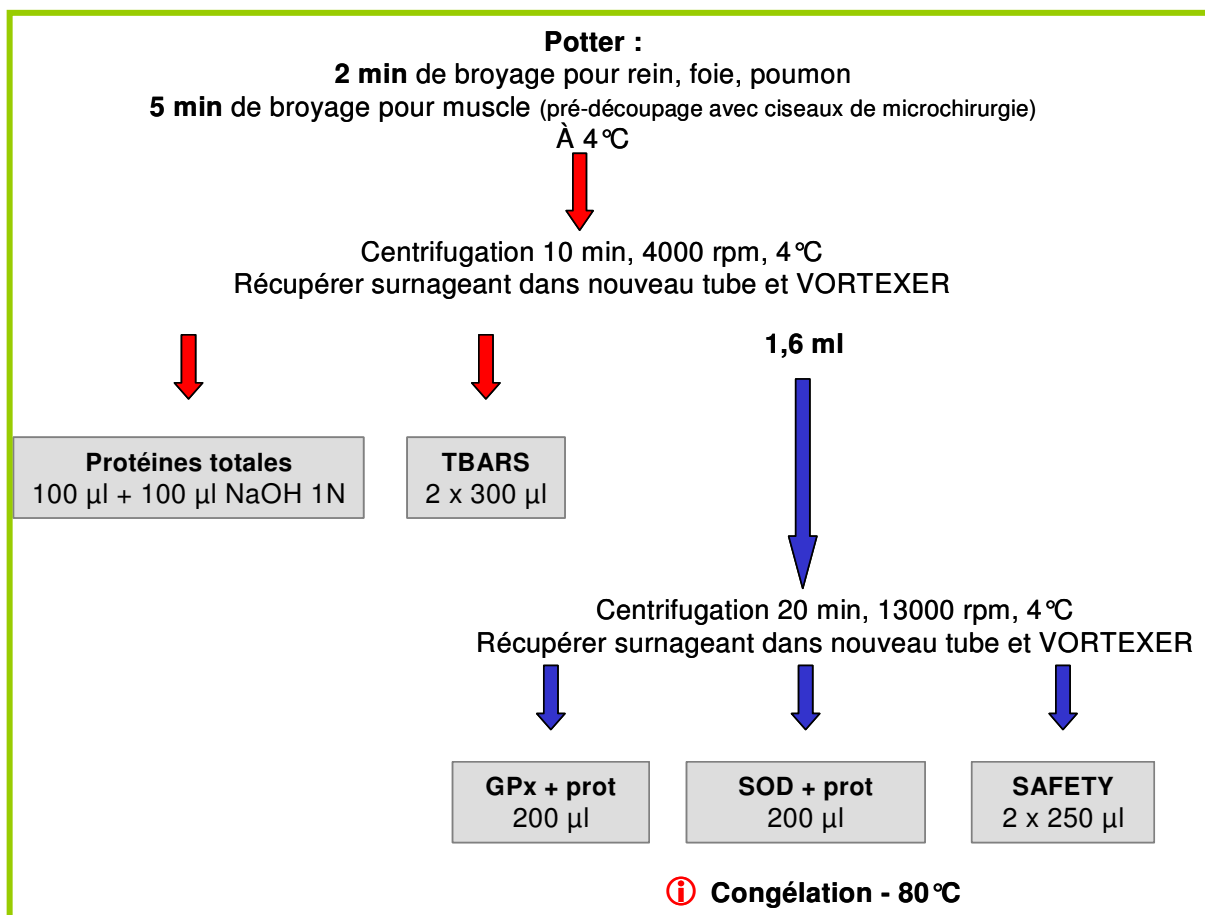


Figure 44 : Schéma descriptif du broyage des organes en vue du dosage des enzymes anti-oxydantes, des TBARs et des protéines.

## 3.2. En vue de la PCR quantitative en temps réel

### • Réactifs

Tampon RLT (Qiagen ; Maryland ; USA)

Tampon de lyse MagNA Pure - LC mRNA isolation kit II (Roche Diagnostics ; Meylan ; France)

### • Broyage

Les organes sont au préalable épongés sur une compresse pour éliminer le maximum de RNAlater®.

La quantité finale doit être, avant extraction de l'ARNm de :

- 8 mg pour le foie
- 15 mg pour le rein
- 5 mg pour le muscle

. Le processus de broyage est résumé dans la figure ci-dessous (Figure 45).

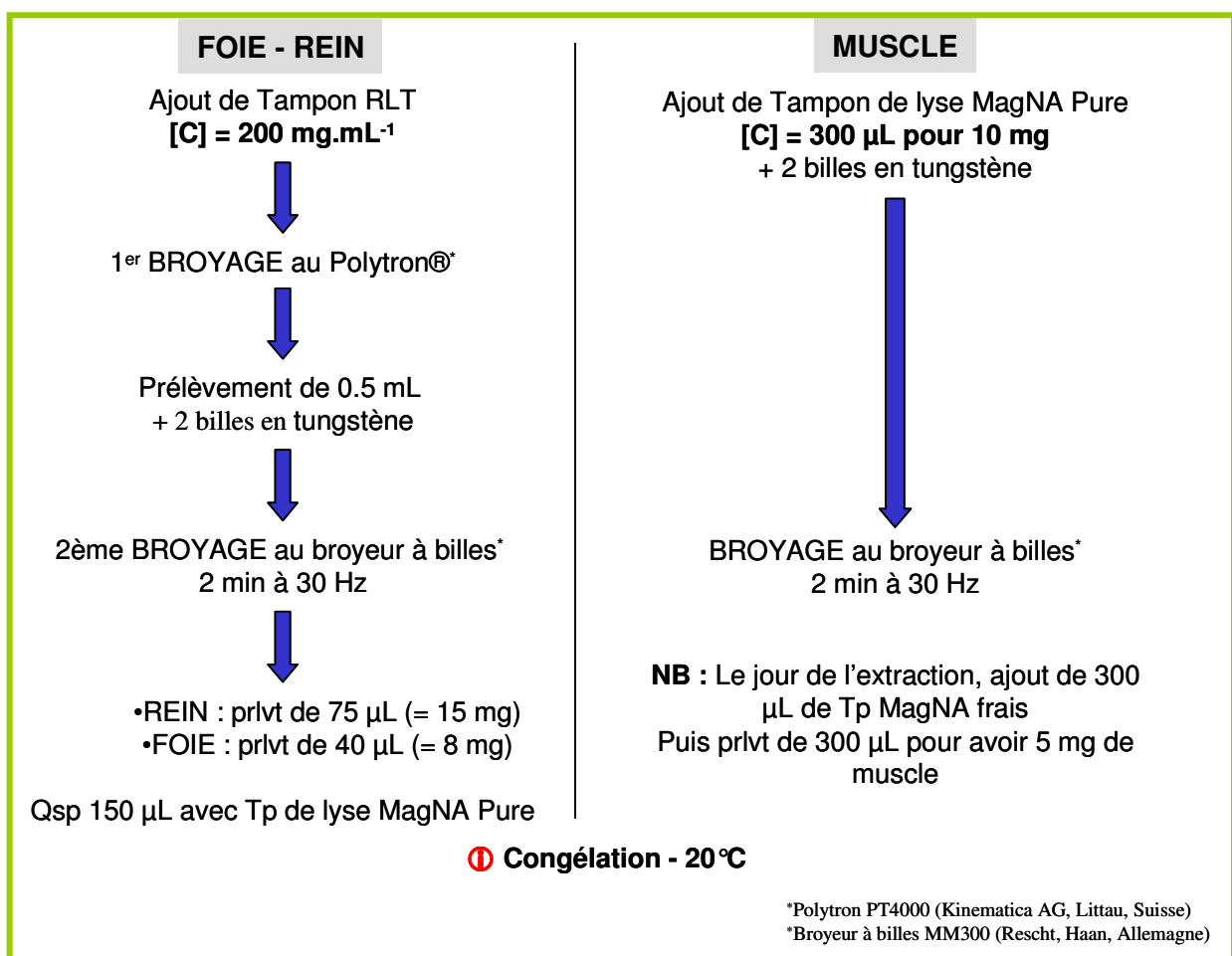


Figure 45 : Schéma descriptif du broyage des organes en vue de la PCR quantitative en temps réel.

## 4. Annexe IV : Détermination des paramètres

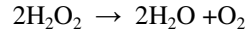
### 4.1. Détermination des enzymes antioxydantes

#### 4.1.1. Dosage de la catalase (CAT)

- **Principe du dosage**

La méthode de dosage a été décrite par Cohen et *al.* (Cohen, 1970)

Le dosage spectrophotométrique est basé sur la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène.



C'est une réaction du premier ordre. La quantité de peroxyde décomposée est directement proportionnelle à la concentration en substrat et la concentration en enzyme.

Pour comparer l'activité des différentes préparations, les conditions de dosage doivent être identiques.

- **Réactifs**

Di-sodium hydrogénophosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$ )

Di-hydrogénophosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O}$ )

Peroxyde d'hydrogène 30%

**Solution A : Tampon phosphate à pH 7 (0.05M)**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  17.9 g pour 1000 mL d'eau

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  4.83 g dans 700 mL d'eau

Ajouter  $\text{Na}_2\text{H}$  à  $\text{NaH}_2$  jusqu'à pH7

**Solution B**

Ajouter 400 $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% dans 200 mL de sol. A

Vérifier la comme ci-dessous.

- **Mode opératoire**

Utilisation d'un spectrophotomètre Uvikon XS (Secomam, Alès, France)

Paramètres : longueur d'onde : 240 nm, incubation : 4s, intervalle de lecture : 10 à 20s,  
nombre de lecture : 30, facteur : 1000

**Témoin**

Dans 2 cuves en Quartz :

2.9 mL de sol. A dans une cuve (référence)

2.9 mL de sol. B dans l'autre cuve

Pour une bonne reproductibilité des résultats, l'absorbance à 240nm doit être comprise entre 0.520 et 0.550.

Si  $\text{DO} > 0.550$ , ajouter de la sol.A à la sol.B

Si  $\text{DO} < 0.520$ , ajouter de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

**Analyse**

Blanc : 2.9ml de sol. A + 0.1ml de prise d'essai de l'échantillon à doser

Echantillon : 2.9ml de sol. B + 0.1ml de prise d'essai

Déclencher la lecture à partir d'une absorbance de 0.450 et l'arrêter à 0.400.

NB : Le volume de la prise d'essai peut varier en fonction de la quantité de catalase présente dans l'échantillon.

**Calcul**

Par définition, le nombre d'unité enzymatique correspond au nombre de  $\mu\text{mole}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  décomposées par minute.

Or, 3.45  $\mu\text{mole}$  sont décomposées quand la variation de DO diminue de 0.05 (entre 0.45 et 0.4).

Le spectrophotomètre UVIKON donne la décroissance de DO par minute ( $\Delta\text{DO}$ ).

Nombre d'unité enzymatique dans le mélange :  $(3.45 \times \Delta\text{DO}) / 0.05$

Nombre d'unité dans 1ml (U/mL) :

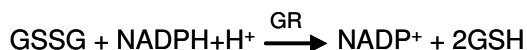
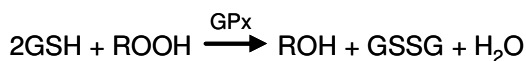
$((3.45 \times \Delta\text{DO}) / 0.05) \times 1000\mu\text{L} / \text{Prise d'essai} (\mu\text{L}) \times 1/1000$  (facteur utilisé par le spectrophotomètre)

## 4.1.2. Dosage de la glutathion peroxydase (GPx)

### • Principe du dosage

La méthode est basée sur celle de Paglia et Valentine (*Paglia, 1967*).

La glutathion peroxydase (GPx) catalyse l'oxydation du glutathion (GSH) via l'hydropéroxyde de cumène. En présence de la glutathion réductase (GR) et de NADPH, le glutathion oxydé (GSSG) est immédiatement converti dans sa forme réduite, simultanément à l'oxydation de NADPH en NADP<sup>+</sup>. La diminution d'absorbance est mesurée à 340 nm.



### • Réactifs et mode opératoire

Le kit RANSEL (RANDOX laboratories ; Crumlin ; Royaume-Uni) a été utilisé pour l'ensemble des dosages sur un automate Hitachi 912. Des contrôles fournis avec le kit permettent de valider les résultats obtenus.

La GPx érythrocytaire est exprimée en U.g<sup>-1</sup> d'hémoglobine.

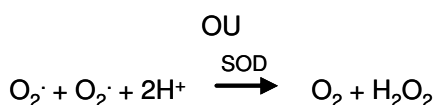
La GPx des organes est exprimée en U.g<sup>-1</sup> de protéines.

## 4.1.3. Dosage de la superoxyde dismutase (SOD)

### • Principe du dosage

La méthode est une adaptation des dosages décrits par Woolliams et *al.* (*Woolliams, 1983*) et Arthur et *al.* (*Arthur, 1985*).

La méthode emploie la xanthine et la xanthine oxydase pour générer des radicaux superoxydes qui réagissent avec le 2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophénol)-5-phényltetrazolium chloride (I.N.T.) pour former le composé formazan rouge. L'activité superoxyde dismutase est ensuite mesurée par le degré d'inhibition de cette réaction. Une unité de SOD diminue de moitié la vitesse de réduction de l'INT dans les conditions du dosage.



### • Réactifs et mode opératoire

Le kit RANSOD (RANDOX laboratories ; Crumlin ; Royaume-Uni) a été utilisé pour l'ensemble des dosages sur un automate Hitachi 912. Des contrôles fournis avec le kit permettent de valider les résultats obtenus.

La SOD érythrocytaire est exprimée en U.g<sup>-1</sup> d'hémoglobine.

La SOD des organes est exprimée en U.g<sup>-1</sup> de protéines.

## 4.2. Détermination des paramètres antioxydants

### 4.2.1. Dosage des espèces réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARs)

#### • Principe du dosage

Les fonctions aldéhydiques du dialdéhyde malonique (MDA), libérées par hydrolyse acide à 95°C réagissent avec l'acide thiobarbiturique pour donner un complexe coloré en rose (MDA(TBA)<sub>2</sub>). Cette méthode fluorimétrique décrite par Richard et *al.* (Richard, 1992) permet la quantification spécifique des complexes formés.



#### • Réactifs

Acide thiobarbiturique (TBA)

Acide perchlorique 70%

Soude

1,1,3,3 – tétraéthoxypropane (TEP)

Éthanol absolu

Butanol 1

#### • Solutions de travail

##### Acide Perchlorique 7%

##### Solution d'acide thiobarbiturique

- Peser dans une coupelle plastique 800 mg de TBA
- Dans un bécher de 150 mL, dissoudre rapidement (moins de 1min) aux ultrasons avec une petite quantité de NaOH 10N
- Ajouter 80mL d'eau désionisée
- Ajuster le pH à 7,4 avec l'ac perchlorique 7%
- Transvaser dans une fiole jaugée de 100 mL et qsp 100mL avec eau désionisée

##### Solution mère de tétraéthoxypropane 20 mmol.L<sup>-1</sup>

- dans une fiole jaugée de 100mL, mettre 480 µL de TEP
- qsp 100 mL avec éthanol absolu
- **sensible à la lumière, mettre dans papier aluminium**

##### Mélange TBA/Ac perchlorique 7% (2V/1V)

Mélanger extemporanément

##### Solution de Standards (dilutions extemporanées)

- Solution fille I : 200µmol.L<sup>-1</sup> (dilution 1/100)  
0.5mL de TEP qsp 50 mL eau désionisée
- Solution fille II : 10 µmol.L<sup>-1</sup> (dilution 1/20)  
1mL de sol fille I qsp 20 mL eau désionisée
- Solutions d'étalonnage :

µmol.L <sup>-1</sup>	1	2	3	4	5	6	7	8
solution fille II (µL)	100	200	300	400	500	600	700	800
eau désionisée (µL)	900	800	700	600	500	400	300	200

#### • Mode opératoire

- Allumer le bain-marie à 95°C
- Décongeler les échantillons à température ambiante
- Homogénéiser sur vortex
- **Utiliser des tubes en polypropylène car haute température et présence de butanol**

	Blanc de gamme	Point de gamme	Blanc de Plasma	Plasma
	100µL eau	100µL étalons (1à8 µM)	100 µL plasma	100 µL échantillon
Mélange TBA/HClO <sub>4</sub>	750 µL			
	Fermer <b>non</b> hermétiquement les tubes – Vortexer			
	Bain-marie 95°C - 60 min			
	Refroidir dans la glace pour arrêter l'hydrolyse (2-3 min)			
Butanol -1	2mL			
	Vortexer			
	Centrifuger 10 min à 4000 tr/min à 4°C			
	Lecture au fluorimètre sur phase supérieure λ d'excitation : 532 nm - λ d'émission : 553 nm			

## 4.2.2. Dosage des groupements thiols (SH)

### • Principe du dosage

Cette méthode colorimétrique repose sur les propriétés réductrices des groupements thiols (-SH) (Faure, 1995). En présence de -SH, le pont disulfure contenu dans le réactif d'Ellman ou DTNB (bis-5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)) va être réduit et donner des dérivés thiols aromatiques fortement colorés (anion 5-thio-2-nitrobenzoate). La vitesse de la réaction sera différente selon que le DTNB se trouve en présence de -SH protéiques ou non protéiques. Cette différence peut, dans certaines conditions (de pH et de force ionique), être accentuée et permettre ainsi la mesure des -SH protéiques et celle des -SH totaux.

### • Réactifs

Di-sodium hydrogénophosphate (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O)	0.05 mol.L <sup>-1</sup>	6.8g dans 1L d'eau
Potassium dihydrogénophosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.05 mol.L <sup>-1</sup>	8.89g dans 1L d'eau
5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)(C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub> )	2.5 mmol.L <sup>-1</sup>	
N Acétyl L cystéine (NAC) (C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> S)	1 mmol.L <sup>-1</sup>	16.32 mg dans 100 mL d'eau
Acide Ethylènediaminetétraacétique (EDTA)		

#### R1 : Tp phosphate 0.05 mmol.L<sup>-1</sup> pH 8

5.5 mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 29mg d'EDTA; qsp 100mL avec Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Contrôler le pH. Si nécessaire ajuster à pH 8 avec soude 1N ou ac phosphorique (HPO<sub>4</sub>) 1M.

#### R2 : Réactif d'Ellman (DTNB)

Dissoudre 10mg de DTNB dans 10ml de R1

### • Mode opératoire

Le dosage des échantillons plasmatiques est réalisé par l'automate Hitachi 912.

Milieu réactionnel : 20 µL d'échantillon + 330 µL de R1 + 30 µL de R2 ; lecture à 415 nm.

#### Gamme étalon de NAC :

L'automate utilise la solution mère de NAC pour réaliser une gamme (100, 250 400 500 et 1000 µL)

**Solution contrôle 1** : Precinorm U (Roche Diagnostic, Mannheim, Allemagne)

**Solution contrôle 2** : Precipath U (Roche Diagnostic, Mannheim, Allemagne)

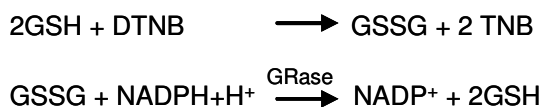
NB : Les protéines sont dosées en parallèle (cf. paragraphe « détermination des protéines totales »)

### 4.2.3. Dosage du glutathion total (GSH) et du glutathion oxydé (GSSG)

- **Principe du dosage**

La méthode a été décrite par Akerboom et al. (Akerboom, 1981).

La forme réduite et oxydée du glutathion est déterminée en utilisant une méthode cinétique où GSH, GSSG et la glutathion réductase (GRase) provoquent une réduction continue du DTNB (agent réducteur des ponts disulfures) par le NADPH selon la réaction suivante :



La formation du 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB) est suivie par spectrophotométrie à 412 nm.

Le GSSG est dosé en rajoutant du 2-vinyl Pyridine dans le milieu réactionnel. Le 2-vinyl Pyridine permet de bloquer les fonctions SH du glutathion réduit.

- **Réactifs**

-Hydroxyde de potassium	5 mol.L <sup>-1</sup>
-Bicarbonate de sodium	0.5 %
-Albumine	60 g.L <sup>-1</sup>
-DTNB	1.5 mg.mL <sup>-1</sup>
-Glutathion réductase	5U.mL <sup>-1</sup>
-NADPH	4 mg.mL <sup>-1</sup>
-acide métaphosphorique	6 %
-MOPS (Acide 3(N-morpholino)propane sulfonique)	
-EDTA disodique	
-Vinyl Pyridine pur	
-Triéthanolamine au ½	

**Tampon MOPS 0.4 mol.L<sup>-1</sup> / EDTA 2mmol.L<sup>-1</sup> pH6.75**

Soit 83.8 g de MOPS et 744.4 mg d'EDTA

qsp 1L eau désionisée – Ajuster le pH à 6.75 avec KOH 5mol.L<sup>-1</sup>

**DTNB 1.5 mg/ml**

Dissoudre le bicarbonate 0.5% - **Garder au noir.**

**NADPH 4mg/ml**

Dissoudre le bicarbonate 0.5% - **Garder au noir.**

**GRase 5U/ml**

Diluer dans le tampon MOPS / EDTA.

**Triéthanolamine**

A diluer au ½ dans l'eau au moment de l'emploi

**Diluant pour la gamme**

1ml de MPA 6% dans 4ml de tampon.

- **Mode opératoire**

- **préparation de la solution Glutathion standard**

Glutathion 20 mmol.L<sup>-1</sup> : 12mg dans 2 ml d'eau

Glutathion 2 mmol.L<sup>-1</sup> : Diluer la solution précédente au 1/10 dans une solution albumineuse à 60g/l (50 µL de la sol. précédente dans 450 µL de sol. albumineuse)

Solution acide de Glutathion 0.2 mmol.L<sup>-1</sup> : déprotéiniser = 200 µL de sol 2mM + 1.8ml de MPA 6%  
Vortexer – Centrifugation (4000 tr – 4°C – 10min)

- **mesure du Glutathion total**

- Préparation de la gamme

Diluer la sol. Standard déprotéinée au 1/5 dans le MOPS – 1 ml dans 4 ml de MOPS  
Préparer les points de gamme **dans le diluant** :

[GSH] µmol.L <sup>-1</sup>	2	4	8	10	16	20	30	40
GSH 40µmol.L <sup>-1</sup> (µL)	50	100	100	250	400	500	750	1000
Diluant (µL)	950	900	400	750	600	500	250	0

- Préparation des échantillons et des contrôles

Diluer les échantillons dans le MOPS de manière à ce que les valeurs rentrent dans la gamme étalon. (1/5 pour du sang humain et de rat - 100 µL dans 400 µL de MOPS).

- Séquence de l'analyse

Préparer 2 cuves pour chaque dosage avec :

- MOPS: 1mL
- NADPH: 50 µL
- GRase: 20 µL
- DTNB: 20 µL
- Échantillon, point de gamme ou blanc: 100 µL

Le blanc se fait avec du MOPS.

Programme UVIKON XS :

Longueur d'onde 412 nm  
Temps d'incubation 10 s  
Intervalle de lecture 20 s  
Nombre de lecture 7  
Activité 10

- Calcul

Lecture sur la gamme DO = f([GSH]) : X µmol.L<sup>-1</sup>

[GSH]<sub>total</sub> = (X x 50) µmol.L<sup>-1</sup> de sang total (50 = dilution – dilution par 10 dans MPA puis par 5 dans MOPS)

- **mesure du Glutathion oxydé (GSSG)**

- Préparation de la gamme (GSSG)

A préparer en même temps que la gamme GSH et à **doser immédiatement**

[GSH] µmol.L <sup>-1</sup>	2	4	8	10	16	20	30
	Prendre 500 µl de chaque point, de la gamme GSH						
Ethanolamine diluée	40µl						
Tampon MOPS	10µl						

- Préparation des échantillons (GSSG)

A préparer exactement 1 heure avant le dosage **dans un tube en polypropylène de 5ml**

Echantillon 500 µL ou 250  
Ethanolamine ½ 40µL 20



2 Vinyl Pyridine (**sous hotte**)  
Attendre **1Heure** – Dosage sur 100 µl

10µL

5

- Séquence de l'analyse

Même séquence d'analyse que pour les Glutathions totaux.

- Calcul

Lecture sur la gamme DO = f([GSSG]) : Y µmol.L<sup>-1</sup>

[GSSG] = Y x 10/2 µmol.L<sup>-1</sup> de sang total (dilution par 10 dans MPA - /2 car nous avons 2 molécules de GSH réduit pour 1 molécule GSSG).

#### 4.2.4. Dosage du statut antioxydant total (TAS)

- **Principe du dosage**

La méthode a été décrite par Miller et al. (Miller, 1993).

ABTS<sup>®</sup> (2,2'-azino-di-[ethylbenzthiazoline sulphonate]) est incubé avec une peroxydase (metmyoglobine) et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour produire le radical ABTS<sup>•+</sup>. Ce produit est de couleur bleu-vert mesurée à 600 nm. Les anti-oxydants présents dans l'échantillon à doser inhibent la production de ce composé de manière proportionnelle à leurs concentrations.



HX-FeII I= Metmyoglobine

X - [FeIV = O] =Ferrylmyoglobine

- **Réactifs et mode opératoire**

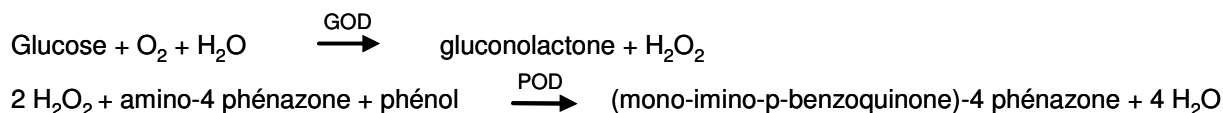
Le kit TAS (RANDOX laboratories ; Crumlin ; Royaume-Uni) a été utilisé pour l'ensemble des dosages sur un automate Hitachi 912. Des contrôles fournis avec le kit permettent de valider les résultats obtenus.

Le TAS est exprimé en mmol.L<sup>-1</sup>.

## 4.3. Détermination des paramètres biochimiques du sang

### 4.3.1. Dosage de la glycémie

En présence de glucose oxydase (GOD), le glucose est oxydé par l'oxygène de l'air en gluconolactone. L'eau oxygénée formée réagit, dans une réaction catalysée par la peroxydase (POD), avec l' amino-4 phénazone et le phénol avec formation d'un coloré rouge. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration en glucose. Cette méthode repose sur des travaux publiés par Trinder *et al.* (Trinder, 1969).

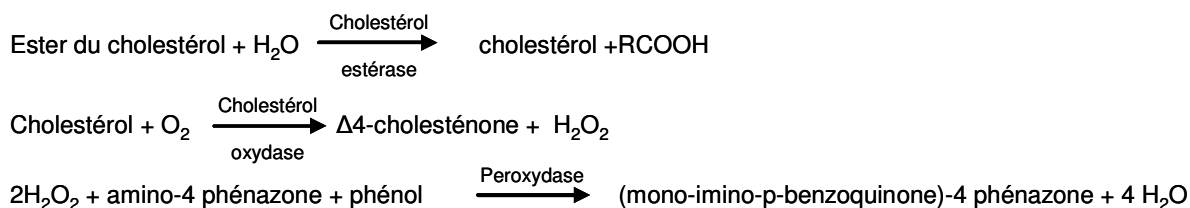


L'analyse est réalisée sur automate (Hitachi 912) par des réactifs ROCHE Diagnostics®.  
La glycémie est exprimée en mmol.L<sup>-1</sup>.

### 4.3.2. Dosage du cholestérol

En 1974, Roeschlau et Allain ont décrit la première méthode entièrement enzymatique de dosage du cholestérol (Roeschlau, 1974).

Sous l'action de la cholestérol-estérase, les esters du cholestérol sont scindés en cholestérol libre et acides gras. Dans une réaction catalysée par la cholestérol-oxydase, le cholestérol est transformé, en présence d'oxygène, en 4-en-3-cholesténone avec formation d'eau oxygénée. En présence de peroxydase, l'eau oxygénée formée réagit avec l' amino-4 phénazone et le phénol avec formation d'un dérivé coloré rouge (réaction de Trinder). L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration en cholestérol.

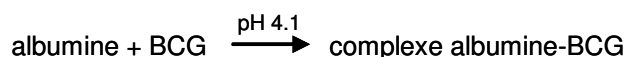


L'analyse est réalisée sur automate (Hitachi 912) à l'aide des réactifs ROCHE Diagnostics®.  
Le taux de cholestérol est exprimé en mmol.L<sup>-1</sup>.

### 4.3.3. Dosage de l'albumine

La méthode a été décrite par Doumas *et al.* (Doumas, 1971).

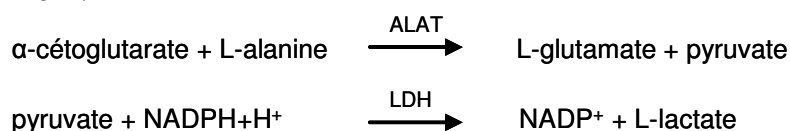
A pH de 4.1, l'albumine présente un caractère suffisamment cationique pour se combiner avec le vert de bromocrésol (BCG) sous forme d'anion pour former un complexe bleu-vert. L'intensité de la coloration développée est directement proportionnelle à la concentration en albumine.



L'analyse est réalisée sur automate (Hitachi 912) à l'aide des réactifs ROCHE Diagnostics®.  
L'albuminémie est exprimée en g.L<sup>-1</sup>.

### 4.3.4. Dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT)

La méthode utilisée dérive de la méthode de référence de l'IFCC (Fédération Internationale de Chimie Clinique) (Bergmeyer, 1986b).



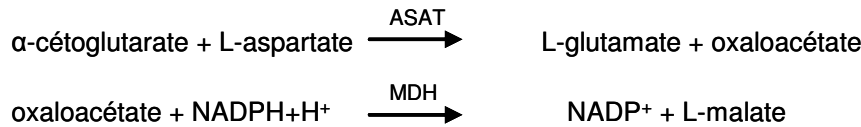
L'ALAT catalyse la première réaction. Le pyruvate formé est dosé à l'aide d'une réaction indicatrice catalysée par la lactate-déshydrogénase. Au cours de cette deuxième réaction, le NADH est oxydé en NAD. La vitesse de diminution du NADH, directement proportionnelle à la vitesse de formation du pyruvate et donc à l'activité de l'ALAT, est mesurée.

L'analyse est réalisée sur automate (Hitachi 912) à l'aide des réactifs ROCHE Diagnostics®.

L'ALAT est exprimée en U.L<sup>-1</sup>.

#### 4.3.5. Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT)

La méthode utilisée dérive de la méthode de référence de l'IFCC (Fédération Internationale de Chimie Clinique) (*Bergmeyer, 1986a*)



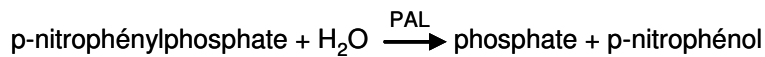
L'ASAT catalyse la première réaction. L'oxaloacétate formé est dosé à l'aide d'une réaction indicatrice catalysée par la malate-déshydrogénase. Au cours de cette deuxième réaction, le NADH est oxydé en NAD. La vitesse de diminution du NADH, directement proportionnelle à la vitesse de formation de l'oxaloacétate et donc à l'activité de l'ASAT, est mesurée.

L'analyse est réalisée sur automate (Hitachi 912) à l'aide des réactifs ROCHE Diagnostics®.

L'ASAT est exprimée en U.L<sup>-1</sup>.

#### 4.3.6. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL)

En présence d'ions Mg<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup>, le p-nitrophénylphosphate est scindé par les phosphatases alcalines en phosphate et p-nitrophénol. La concentration en p-nitrophénol libérée est proportionnelle à l'activité de la phosphatase alcaline et est mesurée par photométrie. (Méthode de Tietz et al. (*Tietz, 1983*))



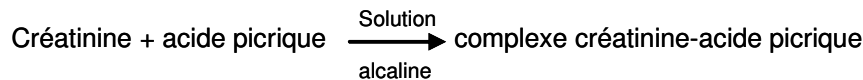
L'analyse est réalisée sur automate (Hitachi 912) à l'aide des réactifs ROCHE Diagnostics®.

La PAL est exprimée en U.L<sup>-1</sup>.

#### 4.3.7. Dosage de la créatinine

La créatinine est dosée selon la méthode de Jaffé (*Bartels, 1972*).

En milieu alcalin, la créatinine forme avec le picrate un complexe jaune orangé. L'intensité de la coloration développée est directement proportionnelle à la concentration en créatinine.



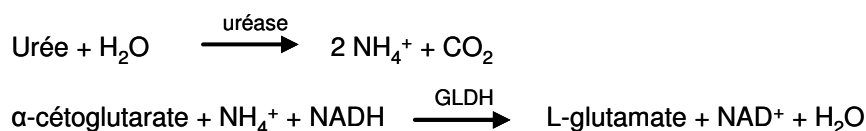
L'analyse est réalisée sur automate (Hitachi 912) à l'aide des réactifs ROCHE Diagnostics®.

Le taux de créatinine est exprimé en μmol.L<sup>-1</sup>.

#### 4.3.8. Dosage de l'urée

Le test repose sur la méthode de Talke et Schubert (*Talke, 1965*).

Sous l'action catalytique de l'uréase, l'urée est hydrolysée en CO<sub>2</sub> et ammoniac. L'ammoniac formée réagit ensuite avec l'α-cétoglutarate et le NADH en présence de glutamate-déshydrogénase (GLDH) avec formation de glutamate et de NAD<sup>+</sup>. La diminution d'extinction due à la consommation de NADH est ensuite mesurée par une méthode cinétique.

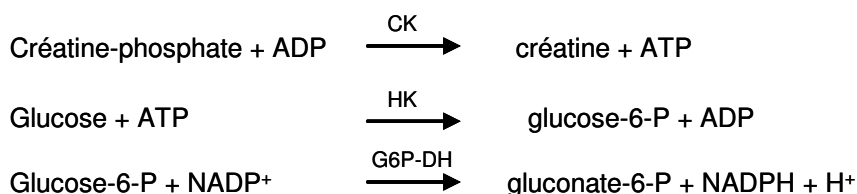


L'analyse est réalisée sur automate (Hitachi 912) à l'aide des réactifs ROCHE Diagnostics®.  
Le taux d'urée est exprimé en mmol.L<sup>-1</sup>.

### 4.3.9. Dosage de la créatine kinase

Des méthodes standardisées ont été recommandées en 1990 par la IFCC (Fédération Internationale de Chimie Clinique) (Horder, 1991).

Des quantités équimolaires de NADPH et d'ATP sont formées à la même vitesse. La vitesse de formation du NADPH est directement proportionnelle à l'activité de la CK.

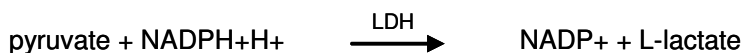


L'analyse est réalisée sur automate (Hitachi 912) à l'aide des réactifs ROCHE Diagnostics®.  
La créatine kinase est exprimée en U.L<sup>-1</sup>.

### 4.3.10. Dosage du lactate déshydrogénase

La présente méthode est dérivée de la formule recommandée par la Société Allemande de Chimie Clinique (DGKC) (1972).

La lactate déshydrogénase (LDH) catalyse la transformation du pyruvate en lactate. Le NADH est oxydée en NAD. La vitesse de diminution du NADH est directement proportionnelle à l'activité de la LDH.



L'analyse est réalisée sur automate (Hitachi 912) à l'aide des réactifs ROCHE Diagnostics®.  
La LDH est exprimé en U.L<sup>-1</sup>.

## 4.4. Détermination de la numération sanguine

Les prélèvements de sang sur EDTA sont immédiatement traités par un automate ABX Pentra 120. (ABX Horiba ; Montpellier ; France)

### 4.5. Détermination des protéines totales

La méthode de détection combine la réduction du Cu<sup>2+</sup> en Cu<sup>+</sup> par les protéines en milieu alcalin (la réaction biuret) avec la détection colorimétrique sélective et hautement sensible de l'ion cuivreux avec un agent contenant de l'acide bicinchoninique (BCA). Le produit coloré (violet) de cette réaction est formé par la chélation de deux molécules de BCA avec un ion Cu<sup>+</sup> (Smith, 1985). Ce complexe présente une forte absorbance à 562 nm qui est linéaire sur une large plage de concentrations en protéines (20 à 2000 µg.mL<sup>-1</sup>).

L'analyse est réalisée sur automate (Hitachi 912) à l'aide des réactifs PIERCE® (Rockford, IL, USA)  
Le taux de protéines totales est exprimé en g.L<sup>-1</sup>.

### 4.6. Détermination du taux d'Hémoglobine

La méthode utilisée suit les recommandations de l'IFCC (Fédération Internationale de Chimie Clinique) (1967). L'hémoglobine est d'abord oxydée par le ferricyanure de potassium en méthémoglobine qui est ensuite convertie en cyanmethémoglobine par le cyanure de potassium. L'absorbance de la cyanmethémoglobine est monitorée à 540 nm.

L'analyse est réalisée sur automate (Hitachi 912) à l'aide des réactifs RANDOX Laboratories® (Crumlin, Royaume-Uni)

L'Hémoglobininémie est exprimé en  $\text{g.L}^{-1}$ .

## 4.7. Endocrinologie

### 4.7.1. Détermination de la corticostérone

Le dosage de la corticostérone plasmatique utilise une méthodologie RIA (RadioImmunoAssay) en phase solide décrite par Al-Dujaili dans laquelle, durant un temps déterminé, une quantité connue de corticostérone radiomarquée à l'iode 125 rentre en compétition avec la corticostérone naturelle présente dans le sérum, vis-à-vis d'anticorps inclus dans la paroi des puits de mesure (*Al-Dujaili, 1981*). Après centrifugation, la radioactivité présente dans le culot contenant les complexes corticostérone-anticorps et corticostérone marquée-anticorps est déterminée.

Les analyses sont réalisées sur compteur gamma (Cobra II series, Packard®, USA) à l'aide du kit fourni par Diagnostic Products Corporation® (Los Angeles, CA, USA).

Le taux de corticostérone est exprimé en  $\text{ng.mL}^{-1}$ .

### 4.7.2. Détermination de l'insuline, de la leptine et du glucagon

Les trois hormones ont été mesurées simultanément en utilisant la méthode « multiplexe » développée par Luminex Corporation™ (Austin, TX, USA). Cette technologie utilise des microsphères en polystyrène de  $5,6 \mu\text{m}$  colorées avec des quantités variables de fluorophores rouges et infrarouges. Chaque bille a donc une signature spectrale unique. Un lot de billes de même signature spectrale peut être combiné à d'autres lots de signatures spectrales différentes au sein d'un même kit. La surface des sphères d'un même lot est couplée à l'agent de capture (Anticorps, oligonucléotides, peptides, récepteur...) correspondant à la molécule d'intérêt. La liaison des molécules d'intérêts aux billes est révélée par un système biotine-streptavidine-phycoérythrine. Avant que ne soient réalisées les mesures, la coloration des billes est discriminée selon le principe de la cytométrie en flux.

L'ensemble des analyses a été réalisé sur un appareil Bioplex™ (Bio-Rad Laboratories®, Hercules, CA, USA) à l'aide de kits LINCOp $lex$  (LINCO Research®, St Charles, MI, USA).

Les taux plasmatiques d'insuline, de leptine et de glucagon sont exprimés en  $\text{ng.mL}^{-1}$ .

## 5. Annexe V : Dosage du zinc et du cuivre plasmatique et tissulaire par spectrométrie d'absorption atomique en flamme (SAAF) ou électrothermique (SAAE)

### 5.1. Principe de la spectrométrie d'absorption (SAA)

La SAA est basée sur le principe que les atomes libres peuvent absorber la lumière d'une certaine longueur d'ondes. Ainsi, un élément dispersé à l'état de vapeur atomique peut absorber le rayonnement caractéristique identique à celui qu'il émet lorsqu'il est soumis à une excitation énergétique : les électrons sont amenés, au cours de l'absorption, à un niveau d'énergie supérieure (Figure 4646).

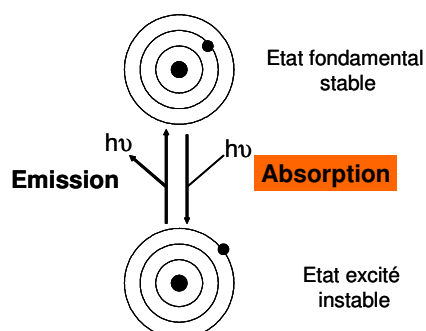


Figure 46 : Principe de la spectrométrie d'absorption atomique

C'est cette faculté d'absorption de l'énergie apportée par des photons de longueurs d'onde bien déterminées qui constitue le principe de base de la méthode.

La source de mesures pour l'absorption atomique la plus courante est la lampe à cathode creuse. Elle consiste en une anode de tungstène et une cathode cylindrique sise dans un tube en verre contenant un gaz inerte, comme l'argon. La cathode est composée de l'élément à analyser. Elle permet l'émission de photons caractéristiques du métal à analyser. (Figure 47)

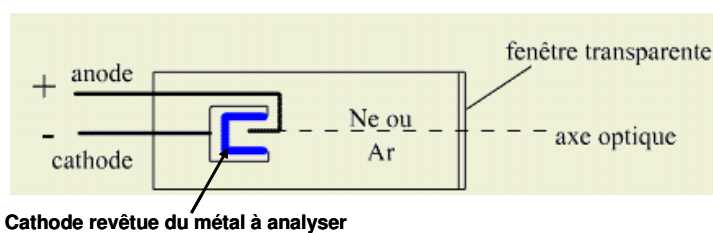


Figure 47 : Schéma de la lampe à cathode creuse

Il faut de la chaleur pour faire passer l'échantillon à l'état gazeux et accéder à des atomes libres. La chaleur est générée par une flamme ou un four de graphite. La SAAF analyse seulement les solutions, tandis que la SAAE analyse les solutions, les boues liquides et les échantillons à l'état solide. En SAAF, la solution est nébulisée grâce à un capillaire et un venturi qui fournit un fin aérosol de la solution, entraîné dans la flamme par les gaz qui l'alimentent (dioxygène et acétylène). L'atomisation se produit dans la flamme qui se situe sur le parcours optique. (Figure 4848)

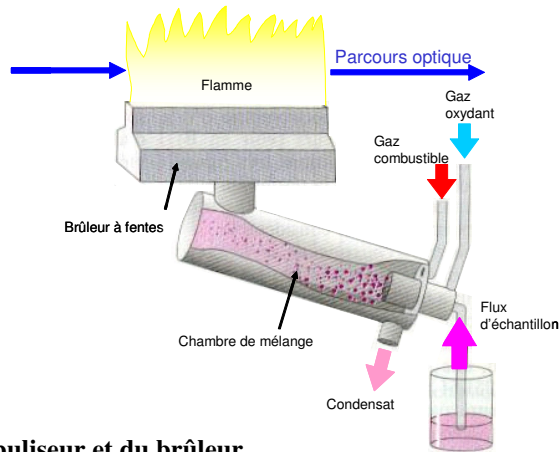
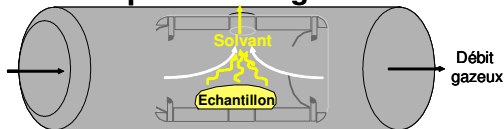


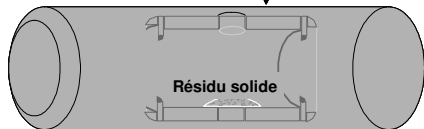
Figure 48 : Schéma du nébuliseur et du brûleur

En SAAE, l'atomisation se produit dans un four graphite cylindrique, ouvert aux deux extrémités et qui contient un trou au centre pour la présentation des échantillons. Deux courants de gaz inertes sont utilisés. Le courant externe empêche l'air de rentrer dans le foyer et le courant interne garantit que les vapeurs générées dans la matrice de l'échantillon soient rapidement éloignées du four. Le gaz le plus communément utilisé est l'argon. Le procédé d'atomisation se déroule selon les étapes schématisées ci-dessous (Figure 49) :

### 1° Étape de séchage

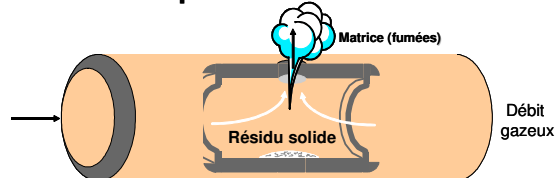


Température en dessous du point d'ébullition du solvant (80-200 °C)



L'évaporation du solvant laisse un film solide de résidu à la surface du tube

### 2° Étape de minéralisation



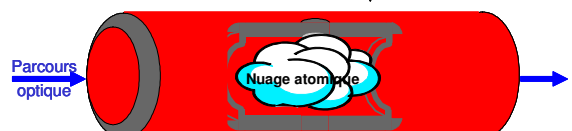
Température permettant de détruire la matrice (350-1600°C)



### 3° Étape d'Atomisation



Chauffage rapide (1000-2000°C/sec)



Vaporisation du résidu, en un nuage d'atome à l'état fondamental, dans le parcours optique (1800 – 3000 °C)

Figure 49 : Schéma du procédé d'atomisation électrothermique

## 5.2. Réalisation des dosages

Dosage du zinc				
Type d'échantillon	Méthode	Mode opératoire		
		Calibrants	Echantillons	Contrôles Qualité
<i>Plasma</i>	SAAF	Calibrants à 1, 2, 4, 6 $\mu$ M préparés à partir d'une solution étalon neuve. Diluant : HCl 0.1M	Dilution au 1/5 dans HCl 0.1M	- UTAK 8634 - Contrôle interne (SBS 2001)
<i>Erythrocytes</i>	SAAF	Idem	- Lyse immédiate après prélèvement (Tampon Tris-HCl 5mM) - Minéralisation - Dilution au 1/50 dans H <sub>2</sub> O	- UTAK 5952
<i>Tissus</i>	SAAF	Idem	- Minéralisation - Dilution* dans HCl 0.1M	- NIST-SRM 1577b (foie de bœuf) - NIST-RM 8414 (muscle de bœuf)

Dosage du cuivre				
Type d'échantillon	Méthode	Mode opératoire		
		Calibrants	Echantillons	Contrôles Qualité
<i>Plasma</i>	SAAF	Calibrants à 1, 2, 4, 6 $\mu$ M préparés à partir d'une solution étalon neuve. Diluant : N-butanol 6%	Dilution au 1/5 dans N-butanol 6%	- UTAK 8634 - Contrôle interne (SBS 2001)
<i>Erythrocytes</i>	SAAF	Idem	- Lyse immédiate après prélèvement (Tampon Tris-HCl 5mM) - Minéralisation - Dilution au 1/5 dans H <sub>2</sub> O	- UTAK 5952
<i>Tissus</i>	SAAE	Calibrants à 2.5, 5, 7.5, 10 $\mu$ M préparés à partir d'une solution étalon neuve. Diluant : HCl 0.1M	- Minéralisation - Dilution* dans HCl 0.1M	- NIST-SRM 1577b - NIST-RM 8414

- **Minéralisation :**

L'analyse des minéraux dans les tissus biologiques nécessite une phase pré-analytique dite de minéralisation. Les échantillons à analyser sont mis en présence d'acide nitrique concentré (1mL / 100 mg de tissu) pendant 24H à température ambiante puis pendant 48H à 50°C.

- **Dilutions :**

*Dilution des minéralisats tissulaires en fonction du dosage réalisé							
	Foie	Rein	Muscle	Intestin	Fémur	Pancréas	Fèces
<b>Zinc</b>	1/50 - 1/20	1/10	1/10	1/10	1/50 - 1/100	1/20	1/100
<b>Cuivre</b>	1/10	1/20	1/5	1/5	1/5	1/5	1/100



- **Calculs des résultats :**

- SAAF : Une droite de calibrage est tracée avec, en abscisse, les concentrations (avant la dernière dilution au 1/5) et, en ordonnée, les absorbances mesurées. La concentration des échantillons est lue directement sur cette droite puisqu'ils sont également dilués au 1/5.

- SAAE : L'appareil donne directement les résultats en  $\mu\text{g}/100\text{mL}$ . En multipliant par la dilution et en divisant par le poids de la prise d'essai, on obtient une concentration en  $\mu\text{g}/\text{g}$ .

- **Contrôle de qualité :**

- UTAK laboratories, Valencia, USA

- National Institute of Standards & Technology (NIST), Gaithersburg, Canada

- Le contrôle interne consiste en un sérum de boeuf dont les paramètres cibles sont dosés puis comparés par un panel de 45 laboratoires.

- **Appareils :**

SAAF : Perkin Elmer 560 (Norwalk, USA)



SAAE : Hitachi Z8270 (Tokyo, Japon)



Figure 50 : Appareils de spectrométrie d'absorption atomique en flamme ou électrothermique.

## 6. Annexe VI : Procédures de dosages des ARNm par RT-PCR en temps réel

réel

Cette technique a pour but de quantifier les ARNm présents dans un échantillon en amplifiant, par des réactions de polymérisation en chaîne ou Polymerase Chain Reaction (PCR), les ADN complémentaires (ADNc) correspondants obtenus par reverse transcription (RT).

Les homogénats tissulaires subissent trois étapes :

1. extraction des ARN messagers totaux
2. transcription inverse (RT)
3. analyse quantitative par PCR en temps réel.

### 6.1. Extraction des ARN messagers

L'extraction est réalisée sur l'automate MagNA Pure LC® (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne) à l'aide d'un kit d'extraction (kit MagNA Pure LC mRNA isolation kit II). Le principe de cette extraction est de mettre le lysat en présence d'oligodéoxythymidine (oligo(dT)) biotinylés afin de lier la queue polyA des ARNm. Les oligo(dT), oligonucléotides comprenant 6 T, vont se fixer de façon complémentaire aux poly-A de l'ARNm présents en 3'. Ce complexe se lie ensuite à la streptavidine couplée à des microbilles magnétiques (SMPs). La liaison biotine-streptavidine forme des complexes ARNm-oligo(dT)-SMPs. Un aimant mobile permet d'isoler ces complexes (**Figure 511**). Les billes sont ensuite lavées avec différents tampons afin d'éliminer les inhibiteurs de PCR, les sels, les protéines et les débris cellulaires. L'ARNm est finalement décroché des particules magnétiques à l'aide d'un tampon d'éluion. Un volume d'éluion final de 50µL contenant les ARNm est obtenu.

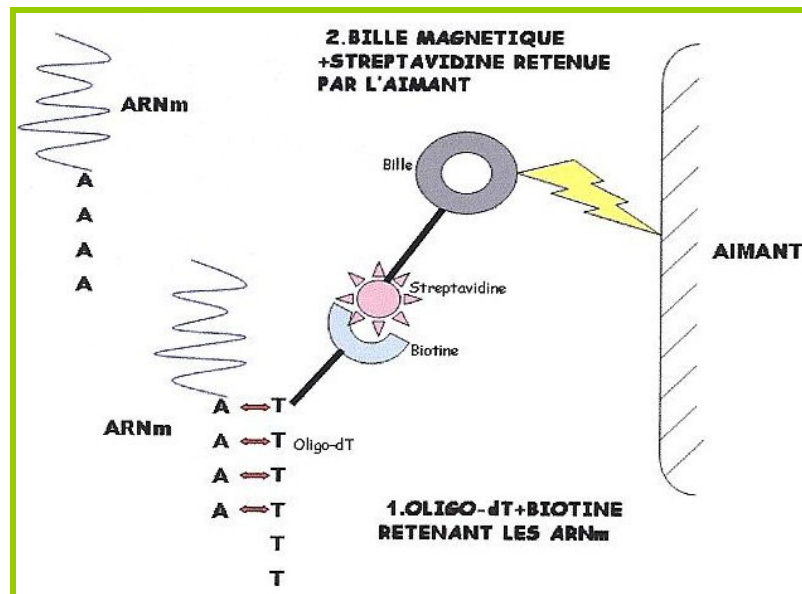


Figure 51: Principe d'extraction des ARNm avec le MagNA Pure LC® (Roche)

En pratique, du tampon de lyse MagNA Pure frais est ajouté aux homogénats tissulaires selon les quantités indiquées en annexe IV. 600µL de tampon d'hybridation contenant les oligo(dT) couplés à la biotine est ajouté. Après centrifugation (17000g ; 5min), 880µL de surnageant sont prélevés et placés dans l'automate. Les divers réactifs (DNase, particules magnétiques de streptavidine, tampons de lavages et d'éluion) et consommables sont ensuite ajoutés dans l'automate qui va alors isoler les ARNm des échantillons.

## 6.2. Transcription inverse des ARN messagers

La transcription inverse ou reverse transcription (RT) est réalisée immédiatement après l'extraction (Reverse transcriptase core kit, Eurogentec, Angers, France). Cette étape va permettre la néo synthèse d'ADN complémentaire issue des ARN messagers purifiés sur MagNA Pure LC. La reverse transcription est réalisée à partir d'amorces oligo(dT) et d'une transcriptase inverse (Moloney Murine Leukemia Virus, MMLV) selon le protocole suivant :

Conformément aux recommandations du fournisseur, 4 µL d'ARNm (soit 0,6 mg de tissu) sont mis en présence de 6 µL d'un mix réactionnel (**Tableau XII**).

**Tableau XII : Préparation du mix permettant la réalisation de la transcription inverse**

Préparation du Mix (n + 1)	
	/tube (µL)
H2O stérile	0,05
<b>Tampon 10X</b>	<b>1</b>
<b>MgCl<sub>2</sub> 25 mM</b>	<b>2</b>
<b>Mix dNTP 2,5 mom</b>	<b>2</b>
<b>Oligo dT 50 µM</b>	<b>0,5</b>
<b>RNase inhibitor 20 U/µl</b>	<b>0,2</b>
Euroscript RT 50 U/µl	0,25
Volume total	6

Incuber les échantillons 10 min à 25°C (appariement des amorces et dénaturation des structures secondaires de l'ARN)

Incuber les échantillons 30 min à 48°C (transcription inverse de l'ARNm)

Incuber les échantillons 5 min à 95°C (dénaturation de l'enzyme)

Refroidir les tubes 5 min dans la glace

Diluer les échantillons au 1/2 (+ 10 µl H<sub>2</sub>O)

Les échantillons d'ADNc sont stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

## 6.3. PCR quantitative en temps réel

La PCR (Polymerase Chain Reaction) ou polymérisation par extension d'amorces est une technique d'amplification de l'ADN mise au point par Mullis en 1986 (*Mullis, 1986*). En 1992, la possibilité de suivre l'amplification de l'ADN cycle par cycle (PCR en temps réel) a permis à cette technique de devenir la méthode de référence de quantification des acides nucléiques. Dans notre protocole, la fluorescence est émise par un intercalant (SybrGreen) qui n'est fluorescent que lorsqu'il est lié à l'ADN double brin.

La PCR quantitative, développée ultérieurement, a pour but de quantifier un échantillon d'ADNc amplifié à l'aide d'amorces spécifiques. Le produit de la PCR est détecté en mesurant en continu (d'où le terme de « temps réel ») la fluorescence causée par la liaison du SybrGreen à l'ADN double brin. Cet intercalant permet donc de révéler l'accumulation des amplicons synthétisés au terme de chaque étape d'extension de la PCR. La dénaturation a pour effet de libérer les molécules de SybrGreen en solution, entraînant une diminution de la fluorescence.

### 6.3.1. Dessin des amorces

Le dessin des amorces est effectué à l'aide du logiciel MacVector Software (Accelrys, San Diego, USA). Dans les conditions de PCR en temps réel avec le thermocycleur Ligcycler et le kit SYBR Green, les critères de recherche d'amorces sont les suivants :

- Région à étudier : jonction de 2 exons
- Taille du produit : 80 à 120 paires de base (pb)
- Caractéristiques des amorces : longueur 18 à 22 pb, pourcentage en GC 48 à 52
- Le dinucléotide 3' : une base faible puis une base forte

Dans la liste des amorces sélectionnées par le logiciel, le choix est porté, de préférence, sur celles ayant les propriétés suivantes :

- Absence de Thymine en 3'
- Pas plus de 2 bases fortes dans les 5 dernières bases, à la limite 3 dans les 6 dernières bases
- Absence de séries de 3 bases fortes ou plus surtout dans la moitié 3' de l'amorce
- Absence de séries de 4 bases faibles ou plus
- Absence de répétitions directes
- Couples d'amorces ayant des températures de fusion (Tm) et un contenu en bases GC proches, si possible de tailles proches
- Tm du produit amplifié le plus bas possible, contenu en bases GC de 60% maximum.

La spécificité de l'amplification de la PCR est vérifiée par analyse de la courbe de fusion (décrite par (Peinnequin, 2004)). Les pics de fusion issues du produit de RT et de l'ADN recombinant spécifique doivent être identiques. Les amorces sont synthétisées par le laboratoire Eurogentec (Seraing, Belgique). Les séquences ainsi que les conditions de PCR de toutes les amorces utilisées lors de nos expérimentations sont récapitulées dans le tableau ci-dessous. (**Tableau XIII**)

**Tableau XIII : Séquences sens et anti-sens et température d'hybridation des amorces utilisées.**

Gène	N° accession Genbank	Séquence amorce 5'-3'	Longueur amplicon (pb)	Température hybridation (°C)
<b>ZnT-1</b>	NM_022853	Sens : GACCAACACGCTAGTGGCTAACA Anti-sens : CCTGGATGAGATTCCCATTTACCT	122	Foie : 56 Rein : 58
<b>ZnT-2</b>	NM_1083122	Sens : CGAGCTGCCTTCATTCATGTG Anti-sens : GATGGGGTCCACGTACTTGTACTC	108	56
<b>ZnT-4</b>	NM_172066	Sens : GGGGGATTTGGTACAAAGTGTTG Anti-sens : CGTACAGATGGGGTCAGCAATC	91	55
<b>Zip2</b>	NM_1107260	Sens : GCTTGCCCTCTGGTTTTAC Anti-sens : ACCCTGTGGTGGTGACCTGTTG	96	55
<b>Zip4</b>	NM_1077669	Sens : AGGAGGGCGAGACTTGGATTC Anti-sens : TGGCTGGGAGCATGTCACAG	78	55
<b>MT-Ia</b>	NM_138826	Sens : GCTTACACCGTTGCTCCAGATTC Anti-sens : GGAGGTGCATTTGCAGTTCTTG	120	58
<b>GAPDH</b>	NM_017008	Sens : CCAATGTATCCGTTGTGGATCTGAC Anti-sens : GCTTACCACCTTCTTGATGTCATC	78	57
<b>HPRT</b>	NM_012583	Sens : CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC Anti-sens : GCAGGTCAGCAAAGAAGCTTATAGCC	123	60
<b>CycA</b>	NM_017101	Sens : GGCAAATGCTGGACCAAACAC Anti-sens : CTTCCCAAAGACCACATGCTTG	94	Rein-Muscle : 56 Foie : 57
<b>ARBP</b>	NM_022402	Sens : CCTGCACACTCGTTCCTAGAG Anti-sens : CAACAGTCGGGTAGCCAATCTG	74	57

### 6.3.2. Réaction de polymérisation en chaîne

Les PCR sont réalisées dans un thermocycleur « LightCycler » à capillaires (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne) avec le réactif « Fast Start DNA Master SYBR Green kit » (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne).

Le volume final de 20 $\mu$ L comprend l'ADNc de l'échantillon à mesurer (selon une concentration déterminée à l'avance), les amorces (0.4  $\mu$ M), du chlorure de magnésium MgCl<sub>2</sub> (4mM), l'enzyme Taq polymérase et l'intercalant SYBR Green®.

Après une première phase d'activation de la polymérase de 10 min à 95°C, 50 cycles d'amplification comportant chacun trois étapes sont réalisés :

- La dénaturation correspond à la séparation des deux brins d'ADN (20s à 95°C).
- L'anneau ou hybridation correspond à la fixation des amorces sur leur séquence complémentaire (température dépendante de la taille et la composition en bases de l'amorce : 55 à 60°C).
- Enfin, l'élongation correspond à la synthèse des brins d'ADNc (8s à 72°C).

Après amplification, l'ADN amplifié est caractérisé par une courbe de fusion qui permet de déterminer la température de fusion (T<sub>m</sub>) de ce produit (Le T<sub>m</sub> correspond à la température à laquelle la moitié des molécules d'ADN, présentes dans une solution, sont dénaturées. Dans un environnement chimique donné, le T<sub>m</sub> est une caractéristique de la molécule d'ADN). La température est augmentée progressivement (0,1°C/s) entraînant la dénaturation progressive des brins d'ADN et, par conséquent, la diminution de la fluorescence (**Figure 522**). L'opposée de la dérivée de la fluorescence mesurée en fonction de la température permet d'identifier le T<sub>m</sub> (**Figure 533**). La visualisation de la température de fusion (T<sub>m</sub>) de chaque échantillon permet ainsi de conclure à la spécificité de la réaction de PCR

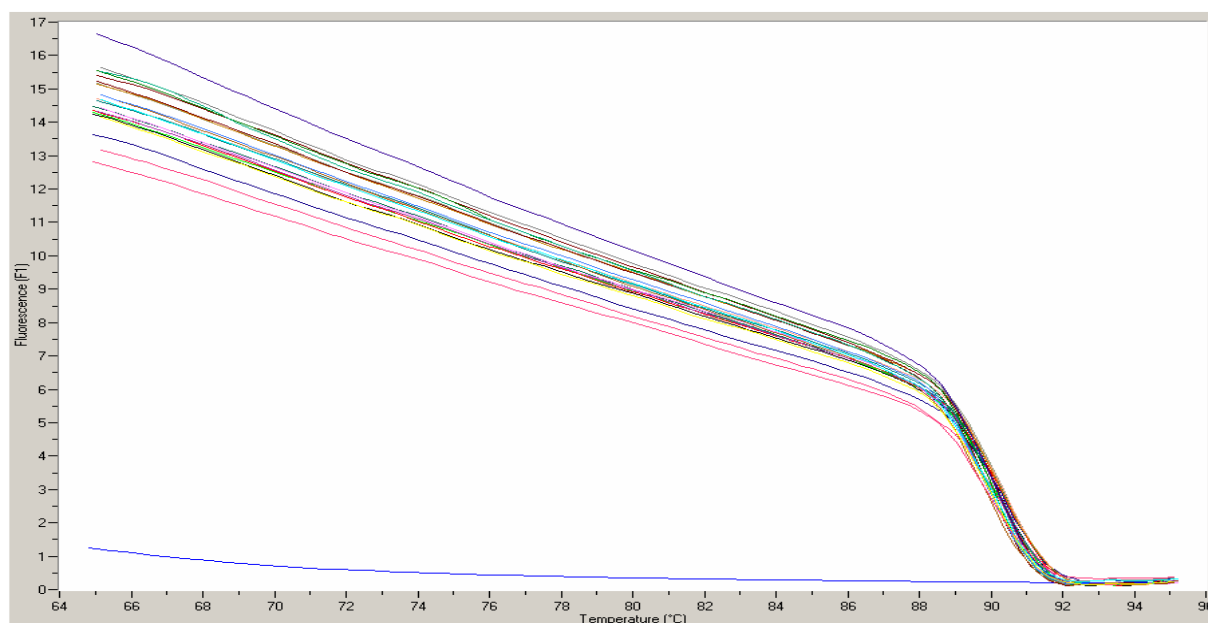
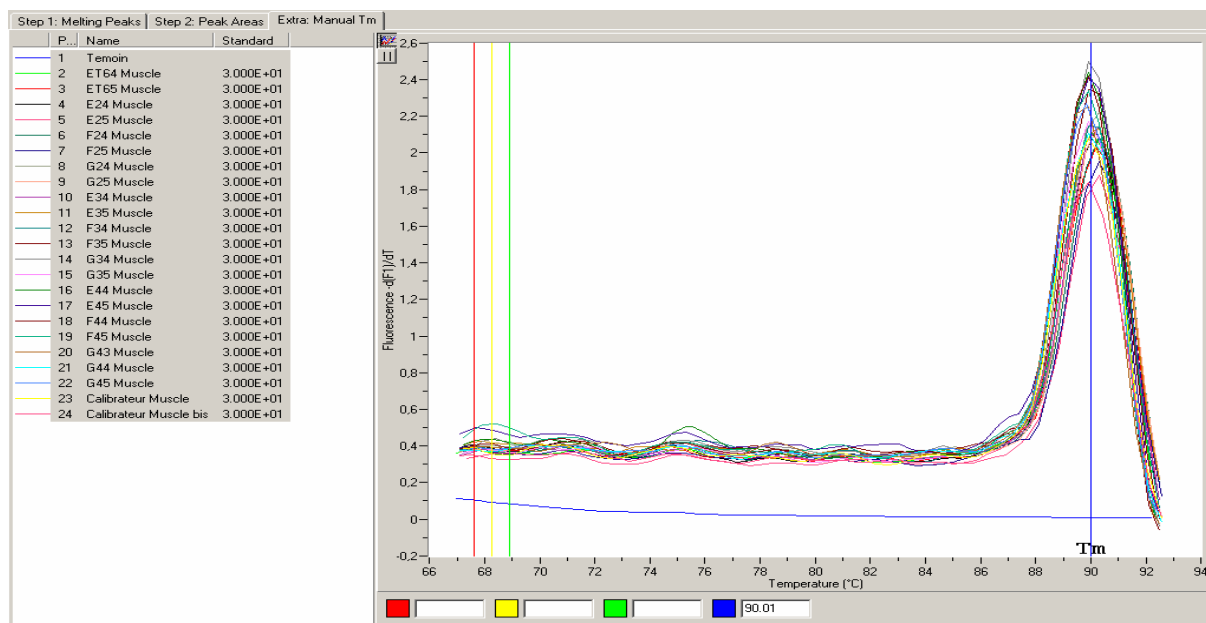


Figure 52 : Courbe de fusion - Mesure de la fluorescence en continu en fonction de la température, pendant une phase de chauffage lente (0,1°C/s) jusqu'à 95°C.

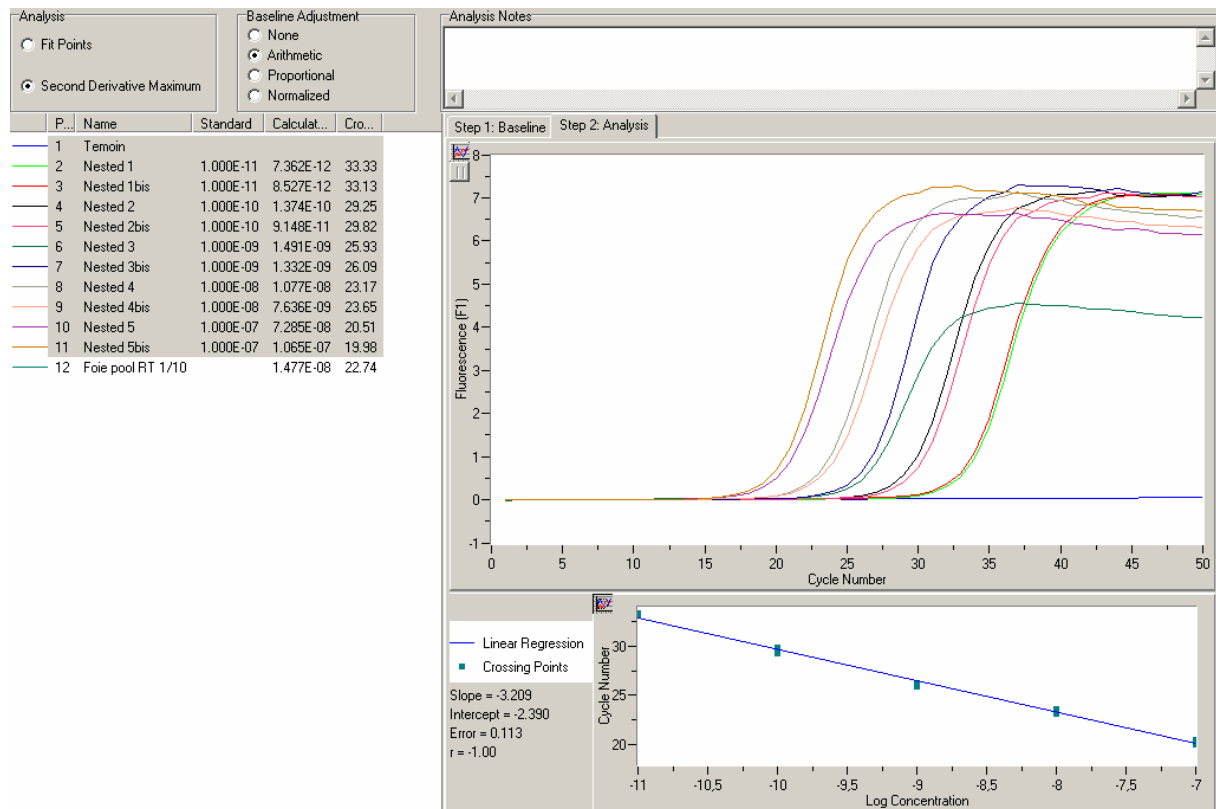


**Figure 53 : Pic de fusion – Opposée de la dérivée de la fluorescence, pour chaque échantillon, mesurée pendant la fusion, en fonction de la température.**  
 (Le tracé de couleur bleue, rectiligne, figure 5 et 6, correspond au contrôle négatif contenant le mélange des réactifs de la PCR sans l'ADNc)

### 6.3.3. Analyse des résultats

La synthèse d'ADN réalisée à chaque cycle est estimée par la mesure de la fluorescence à la fin de chaque étape d'élongation. Cette mesure permet de tracer la courbe de fluorescence en fonction du nombre de cycles d'amplification (**Figure 544**). Cette courbe est composée de trois parties : une phase initiale exponentielle, une phase intermédiaire pendant laquelle le rendement de la réaction diminue et une phase finale « plateau » qui traduit l'arrêt de l'amplification. La mesure de la fluorescence, pendant la phase exponentielle, permet de déterminer le cycle de sortie ( $C_p$  ou  $C_t$  en fonction de la méthode de détermination utilisée). Cette valeur correspond au cycle d'amplification, auquel la fluorescence due à l'ADN synthétisé, est significativement supérieure au bruit de fond. Le  $C_t$  est d'autant plus précoce que la quantité d'ADNc cible présent initialement est importante. Il est utilisé pour calculer la quantité d'ADNc initiale sur la base d'un modèle exponentiel de l'amplification.

La spécificité de l'amplification est vérifiée par une étude de la courbe de fusion pour chaque échantillon, avant la phase d'analyse quantitative. Pour chaque échantillon, le  $C_t$  est déterminé par la méthode dite du « maximum de la dérivée seconde » (logiciel Light Cycler Software v.3.5, Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne). Cette méthode, indépendante du manipulateur, permet d'augmenter le *ratio* signal sur bruit en mesurant le  $C_t$  à la fin de la phase exponentielle en utilisant la méthode de la dérivée seconde.



**Figure 54 : Courbe de fluorescence en fonction du nombre de cycles d'amplification**

La quantification relative de l'ADNc, présent dans chaque échantillon, est réalisée par rapport au pool de la totalité des échantillons de chaque organe (calibrateur), par la méthode dite de « comparaison des cycles de sorties » (Livak, 2001). Cette méthode, basée sur un modèle mathématique exponentiel, utilise les différences de  $C_p$  entre chaque échantillon et le calibrateur pour le gène cible et les gènes de référence. Elle suppose une efficacité théorique de PCR de 100 %.

Pour tenir compte des différences de rendement des étapes pré-analytiques (extraction d'ADN, transcription inverse...) entre les échantillons, les résultats sont normalisés par rapport à des contrôles internes appelés « gènes de référence ». Cette normalisation est effectuée par la moyenne géométrique d'au moins trois gènes de référence validés sur nos échantillons (Vandesompele, 2002). Cette méthode permet de déterminer à l'aide du logiciel Genorm® d'une part les gènes de référence les plus stables et d'autre part le nombre de gènes de référence à utiliser. En raison du modèle mathématique choisi, ce nombre ne peut être inférieur à trois. Dans notre étude, les gènes de référence utilisés sont : le gène de la Cyclophiline A (CycA), celui de l'hypoxanthine-guanine phosphorybosyl transférase (HPRT), celui de la phosphoprotéine ribosomale acide P0 (ARBP) et celui de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). La normalisation obtenue par la moyenne géométrique de ARBP, HPRT et GAPDH est validée par le logiciel pour le rein. Pour le foie et le muscle, le coefficient de stabilité est inférieur au seuil de 0,15, valeur à partir de laquelle l'ajout d'un gène de normalisation est nécessaire ; l'utilisation supplémentaire du gène CycA a permis de faire passer ce coefficient sous la valeur seuil.

# **Bibliographie**





- (1967). International committee for standardization in haematology. Recommendations for haemoglobinometry in human blood. *Br J Haematol.* 13, 71-5.
- (1972). Recommendations of the German Society for Clinical Chemistry. Standardisation of methods for the estimation of enzyme activities in biological fluids. Experimental basis for the optimized standard conditions. *Z Klin Chem Klin Biochem.* 10, 281-91.
- Abdulla M (1986) Inorganic chemical elements in prepared meals in sweden.Lund.
- Abel J, de Ruiter N. (1989). Inhibition of hydroxyl-radical-generated DNA degradation by metallothionein. *Toxicol Lett.* 47, 191-6.
- Agay D, Anderson RA, Sandre C, Bryden NA, Alonso A, Roussel AM, Chancerelle Y. (2005). Alterations of antioxidant trace elements (Zn, Se, Cu) and related metallo-enzymes in plasma and tissues following burn injury in rats. *Burns.* 31, 366-71.
- Agay D, Spadoni S, Almeras D, Galois-Guibal L, Touvard L, Chancerelle Y. (2007). Enquête relative à la supplémentation en vitamines et en éléments traces dans les centres de traitements des brûlés. *Brûlures.* VIII, 127-33.
- Akerboom TP, Sies H. (1981). Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77, 373-82.
- Al-Dujaili EA, Williams BC, Edwards CR. (1981). The development and application of a direct radioimmunoassay for corticosterone. *Steroids.* 37, 157-76.
- Allgower M, Schoenenberger GA, Sparkes BG. (1995). Burning the largest immune organ. *Burns.* 21 Suppl 1, S7-47.
- Amara S, Abdelmelek H, Garrel C, Guiraud P, Douki T, Ravanat JL, Favier A, Sakly M, Ben Rhouma K. (2008). Preventive effect of zinc against cadmium-induced oxidative stress in the rat testis. *J Reprod Dev.* 54, 129-34.
- Anderson RA, Roussel AM, Zouari N, Mahjoub S, Matheau JM, Kerkeni A. (2001). Potential antioxidant effects of zinc and chromium supplementation in people with type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr.* 20, 212-8.
- Andriollo-Sanchez M, Claeysen R, Arnaud J, Touvard L, Denis J, Chancerelle Y, Roussel AM, Agay D. (2008a). Toxic effects of iterative intraperitoneal administration of zinc gluconate in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 103, 267-72.
- Andriollo-Sanchez M, Hininger-Favier I, Meunier N, Venneria E, O'Connor JM, Maiani G, Polito A, Bord S, Ferry M, Coudray C, Roussel AM. (2008b). No antioxidant beneficial effect of zinc supplementation on oxidative stress markers and antioxidant defenses in middle-aged and elderly subjects: the Zenith study. *J Am Coll Nutr.* 27, 463-9.
- Anstey A, Marks R, Long C, Navabi H, Pearse A, Wynford-Thomas D, Jasani B. (1996). In vivo photoinduction of metallothionein in human skin by ultraviolet irradiation. *J Pathol.* 178, 84-8.
- Apostolova MD, Choo KH, Michalska AE, Tohyama C. (1997). Analysis of the possible protective role of metallothionein in streptozotocin-induced diabetes using metallothionein-null mice. *J Trace Elem Med Biol.* 11, 1-7.

- Arai K, Maguchi S, Fujii S, Ishibashi H, Oikawa K, Taniguchi N. (1987). Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase. Identification of the in vitro glycated sites. *J Biol Chem.* 262, 16969-72.
- Arthur JR, Boyne R. (1985). Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. *Life Sci.* 36, 1569-75.
- Asahina T, Kashiwagi A, Nishio Y, Ikebuchi M, Harada N, Tanaka Y, Takagi Y, Saeki Y, Kikkawa R, Shigeta Y. (1995). Impaired activation of glucose oxidation and NADPH supply in human endothelial cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in high-glucose medium. *Diabetes.* 44, 520-6.
- Atakisi O, Atakisi E, Kart A. (2009). Effects of Dietary Zinc and L: -Arginine Supplementation on Total Antioxidants Capacity, Lipid Peroxidation, Nitric Oxide, Egg Weight, and Blood Biochemical Values in Japanese Quails. *Biol Trace Elem Res.*
- ATSDR. (2003). Toxicological profiles Zinc. Atlanta. Agency for toxic substances and disease registry - U.S. department of Health and Human Services, Public Health Services.
- Aughey E, Grant L, Furman BL, Dryden WF. (1977). The effects of oral zinc supplementation in the mouse. *J Comp Pathol.* 87, 1-14.
- Aydemir TB, Blanchard RK, Cousins RJ. (2006). Zinc supplementation of young men alters metallothionein, zinc transporter, and cytokine gene expression in leukocyte populations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 1699-704.
- Baer MT, King JC. (1984). Tissue zinc levels and zinc excretion during experimental zinc depletion in young men. *Am J Clin Nutr.* 39, 556-70.
- Baer MT, King JC, Tamura T, Margen S, Bradfield RB, Weston WL, Daugherty NA. (1985). Nitrogen utilization, enzyme activity, glucose intolerance and leukocyte chemotaxis in human experimental zinc depletion. *Am J Clin Nutr.* 41, 1220-35.
- Baltaci AK, Sunar F, Mogulkoc R, Oztekin E. (2004). The effects of zinc deficiency and supplementation on lipid peroxidation in bone tissue of ovariectomized rats. *Toxicology.* 203, 77-82.
- Bancila V, Cens T, Monnier D, Chanson F, Faure C, Dunant Y, Bloc A. (2005). Two SUR1-specific histidine residues mandatory for zinc-induced activation of the rat KATP channel. *J Biol Chem.* 280, 8793-9.
- Bao B, Prasad AS, Beck FW, Godmere M. (2003). Zinc modulates mRNA levels of cytokines. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285, E1095-102.
- Bao B, Prasad AS, Beck FW, Snell D, Suneja A, Sarkar FH, Doshi N, Fitzgerald JT, Swerdlow P. (2008). Zinc supplementation decreases oxidative stress, incidence of infection, and generation of inflammatory cytokines in sickle cell disease patients. *Transl Res.* 152, 67-80.
- Bartels H, Bohmer M, Heierli C. (1972). [Serum creatinine determination without protein precipitation]. *Clin Chim Acta.* 37, 193-7.
- Bayer-Berger MM, Cavadini C, Mansourian R. (1989). Zinc, copper and selenium cutaneous losses and balances in burn patients. *J Trace Elem Exp Med.* 2, 208.
- Baynes JW. (1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* 40, 405-12.

- Beattie H, Bremner I. (2000). Metallothioneins: their cellular function and relationship with zinc. In AM Roussel, RA Anderson, AE Favier eds. *Trace elements in man and animals*; pp. 961-7. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers.
- Beghin-Heick N, Dalpe-Scott M, Rowe J, Heick HM. (1985). Zinc supplementation attenuates insulin secretory activity in pancreatic islets of the ob/ob mouse. *Diabetes*. 34, 179-84.
- Begum NA, Kobayashi M, Moriwaki Y, Matsumoto M, Toyoshima K, Seya T. (2002). Mycobacterium bovis BCG cell wall and lipopolysaccharide induce a novel gene, BIGM103, encoding a 7-TM protein: identification of a new protein family having Zn-transporter and Zn-metalloprotease signatures. *Genomics*. 80, 630-45.
- Beletate V, El Dib RP, Atallah AN. (2007). Zinc supplementation for the prevention of type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev*. CD005525.
- Bentley PJ, Grubb BR. (1991). Experimental dietary hyperzincemia tissue disposition of excess zinc in rabbits. *Trace Elem Med*. 8, 202-7.
- Berger mm. (2004). Besoins en micronutriments des brûlés. *Brûlures*. 5, 55-67.
- Berger MM. (2006). Antioxidant micronutrients in major trauma and burns: evidence and practice. *Nutr Clin Pract*. 21, 438-49.
- Berger MM, Baines M, Raffoul W, Benathan M, Chiolero RL, Reeves C, Revely JP, Cayeux MC, Senechaud I, Shenkin A. (2007). Trace element supplementation after major burns modulates antioxidant status and clinical course by way of increased tissue trace element concentrations. *Am J Clin Nutr*. 85, 1293-300.
- Berger MM, Cavadini C, Bart A, Blondel A, Bartholdi I, Vandervale A, Krupp S, Chiolero R, Freeman J, Dirren H. (1992a). Selenium losses in 10 burned patients. *Clin Nutr*. 11, 75-82.
- Berger MM, Cavadini C, Bart A, Mansourian R, Guinchard S, Bartholdi I, Vandervale A, Krupp S, Chiolero R, Freeman J, et al. (1992b). Cutaneous copper and zinc losses in burns. *Burns*. 18, 373-80.
- Berger MM, Cavadini C, Chiolero R, Guinchard S, Krupp S, Dirren H. (1994). Influence of large intakes of trace elements on recovery after major burns. *Nutrition*. 10, 327-34; discussion 52.
- Berger MM, Chiolero R. (1995). Relations between copper, zinc and selenium intakes and malondialdehyde excretion after major burns. *Burns*. 21, 507-12.
- Berger MM, Rothen C, Cavadini C, Chiolero RL. (1997). Exudative mineral losses after serious burns: a clue to the alterations of magnesium and phosphate metabolism. *Am J Clin Nutr*. 65, 1473-81.
- Berger MM, Shenkin A. (1998a). Trace elements in trauma and burns. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 1, 513-7.
- Berger MM, Spertini F, Shenkin A, Wardle C, Wiesner L, Schindler C, Chiolero RL. (1998b). Trace element supplementation modulates pulmonary infection rates after major burns: a double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 68, 365-71.
- Bergmeyer HU, Horder M, Rej R. (1986a). International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Scientific Committee, Analytical Section: approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase (L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.1). *J Clin Chem Clin Biochem*. 24, 497-510.

- Bergmeyer HU, Horder M, Rej R. (1986b). International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Scientific Committee, Analytical Section: approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase (L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2). *J Clin Chem Clin Biochem.* 24, 481-95.
- Bertin-Maghit M, Goudable J, Dalmas E, Steghens JP, Bouchard C, Gueugniaud PY, Petit P, Delafosse B. (2000). Time course of oxidative stress after major burns. *Intensive Care Med.* 26, 800-3.
- Beyaert R, Heyninck K, Van Huffel S. (2000). A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor-kappa B-dependent gene expression and apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 60, 1143-51.
- Biego GH, Joyeux M, Hartemann P, Debry G. (1998). Daily intake of essential minerals and metallic micropollutants from foods in France. *Sci Total Environ.* 217, 27-36.
- Bishop GM, Dringen R, Robinson SR. (2007). Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. *Free Radic Biol Med.* 42, 1222-30.
- Bleck O, Ashton GH, Mallipeddi R, South AP, Whittock NV, McLean WH, Atherton DJ, McGrath JA. (2001). Genomic localization, organization and amplification of the human zinc transporter protein gene, ZNT4, and exclusion as a candidate gene in different clinical variants of acrodermatitis enteropathica. *Arch Dermatol Res.* 293, 392-6.
- Bloss T, Clemens S, Nies DH. (2002). Characterization of the ZAT1p zinc transporter from *Arabidopsis thaliana* in microbial model organisms and reconstituted proteoliposomes. *Planta.* 214, 783-91.
- Boosalis MG, Solem LD, Ahrenholz DH, McCall JT, McClain CJ. (1986). Serum and urinary selenium levels in thermal injury. *Burns Incl Therm Inj.* 12, 236-40.
- Boosalis MG, Solem LD, Cerra FB, Konstantinides F, Ahrenholz DH, McCall JT, McClain CJ. (1991). Increased urinary zinc excretion after thermal injury. *J Lab Clin Med.* 118, 538-45.
- Boosalis MG, Solem LD, McCall JT, Ahrenholz DH, McClain CJ. (1988). Serum zinc response in thermal injury. *J Am Coll Nutr.* 7, 69-76.
- Boquist L, Falkmer S, Havu N, Pihl E. (1968). Insulin biosynthesis, storage, and secretion: pancreatic islet cells and islet cells. *Lakartidningen.* 65, 3603-7.
- Bowie A, O'Neill LA. (2000). Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol.* 59, 13-23.
- Bravi MC, Pietrangeli P, Laurenti O, Basili S, Cassone-Faldetta M, Ferri C, De Mattia G. (1997). Polyol pathway activation and glutathione redox status in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism.* 46, 1194-8.
- Bray TM, Kubow S, Bettger WJ. (1986). Effect of dietary zinc on endogenous free radical production in rat lung microsomes. *J Nutr.* 116, 1054-60.
- Brun JF, Guintrand-Hugret R, Fons C, Carvajal J, Fedou C, Fussellier M, Bardet L, Orsetti A. (1995). Effects of oral zinc gluconate on glucose effectiveness and insulin sensitivity in humans. *Biol Trace Elem Res.* 47, 385-91.

- Bruno RS, Song Y, Leonard SW, Mustacich DJ, Taylor AW, Traber MG, Ho E. (2007). Dietary zinc restriction in rats alters antioxidant status and increases plasma F2 isoprostanes. *J Nutr Biochem.* 18, 509-18.
- Budagov RS, Ulianova LP, Smoryzanova OA, Rott GM. (2001). [Increase in the level of metallothioneins in mouse liver after administration of cadmium chloride does not protect from combined radiation-thermal injury]. *Radiats Biol Radioecol.* 41, 671-6.
- Bull JP, Fisher AJ. (1954). A study of mortality in a burns unit: a revised estimate. *Ann Surg.* 139, 269-74.
- Bunk MJ, Dnistrian AM, Schwartz MK, Rivlin RS. (1989). Dietary zinc deficiency decreases plasma concentrations of vitamin E. *Proc Soc Exp Biol Med.* 190, 379-84.
- Burke DM, DeMicco FJ, Taper LJ, Ritchey SJ. (1981). Copper and zinc utilization in elderly adults. *J Gerontol.* 36, 558-63.
- Calder PC. (2001). Nutrition et fonction immunitaire. *Nutr Clin Metabol.* 15, 286-97.
- Calder PC, Jackson AA. (2000). Undernutrition, infection and immune function. *Nutr Res Rev.* 13, 3-29.
- Cao G. (1991a). [Effects of zinc deficiency and supplements on lipid peroxidation and superoxide dismutase in mice]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 71, 623-6, 44.
- Cao GH, Chen JD. (1991b). Effects of dietary zinc on free radical generation, lipid peroxidation, and superoxide dismutase in trained mice. *Arch Biochem Biophys.* 291, 147-53.
- Cao J, Bobo JA, Liuzzi JP, Cousins RJ. (2001). Effects of intracellular zinc depletion on metallothionein and ZIP2 transporter expression and apoptosis. *J Leukoc Biol.* 70, 559-66.
- Carter EA. (1998). Insulin resistance in burns and trauma. *Nutr Rev.* 56, S170-6.
- CE. (1999). Risk assessment for zinc. Part 2 : Human health. Brussels. European Commission.
- Chai F, Truong-Tran AQ, Ho LH, Zalewski PD. (1999). Regulation of caspase activation and apoptosis by cellular zinc fluxes and zinc deprivation: A review. *Immunol Cell Biol.* 77, 272-8.
- Chandra RK. (1984). Excessive intake of zinc impairs immune responses. *Jama.* 252, 1443-6.
- Chandra RK. (1991). 1990 McCollum Award lecture. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *Am J Clin Nutr.* 53, 1087-101.
- Chandra RK. (1997). Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr.* 66, 460S-3S.
- Chao Y, Fu D. (2004). Kinetic study of the antiport mechanism of an Escherichia coli zinc transporter, ZitB. *J Biol Chem.* 279, 12043-50.
- Chen X, Qin F, Cheng S. (2001). [The protective effects of Zn-metallothionein on severely scalded rats inflicted by oxygen free radicals]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 17, 46-8.
- Cheng S, Tang SC. (1990). Metallothionein as a scavenger of free radicals. *Metals ions in biology and medicine*; pp. 24-6. Paris: John Libbey.
- Chimienti F, Devergnas S, Favier A, Seve M. (2004). Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes.* 53, 2330-7.

- Chubatsu LS, Meneghini R. (1993). Metallothionein protects DNA from oxidative damage. *Biochem J.* 291, 193-8.
- Chvapil M, Ryan JN, Elias SL, Peng YM. (1973). Protective effect of zinc on carbene tetrachloride-induced liver injury in rats. *Exp Mol Pathol.* 19, 186-96.
- Chvapil M, Stankova L, Zukoski CT, Zukoski C. (1977). Inhibition of some functions of polymorphonuclear leukocytes by in vitro zinc. *J Lab Clin Med.* 19, 186-96.
- Claeysen R, Andriollo-Sanchez M, Arnaud J, Touvard L, Alonso A, Chancerelle Y, Roussel AM, Agay D. (2008). Burn-induced oxidative stress is altered by a low zinc status: kinetic study in burned rats fed a low zinc diet. *Biol Trace Elem Res.* 126 Suppl 1, S80-96.
- Claeysen R, Andriollo-Sanchez M, Arnaud J, Touvard L, Alonso A, Chancerelle Y, Roussel AM, Agay D. (2009). Effect of sub-deficient zinc status on insulin sensitivity after burn injury in rats. *Biol Trace Elem Res.* 127, 132-42.
- Clifford KS, MacDonald MJ. (2000). Survey of mRNAs encoding zinc transporters and other metal complexing proteins in pancreatic islets of rats from birth to adulthood: similar patterns in the Sprague-Dawley and Wistar BB strains. *Diabetes Res Clin Pract.* 49, 77-85.
- Cohen G, Dembiec D, Marcus J. (1970). Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal Biochem.* 34, 30-8.
- Colin MA, Taper LJ, Ritchey SJ. (1983). Effect of dietary zinc and protein levels on the utilization of zinc and copper by adult females. *J Nutr.* 113, 1480-8.
- Colvin RA, Davis N, Nipper RW, Carter PA. (2000). Zinc transport in the brain: routes of zinc influx and efflux in neurons. *J Nutr.* 130, 1484S-7S.
- Connell P, Young VM, Toborek M, Cohen DA, Barve S, McClain CJ. (1997). Zinc attenuates tumor necrosis factor-mediated activation of transcription factors in endothelial cells. *J Am Coll Nutr.* 16, 411-7.
- Cortese MM, Suschek CV, Wiebke W, Kröncke K-D, Kolb-Bachofen V. (2008). Zinc protects endothelial cells from hydrogen peroxide via Nrf2-dependant stimulation of glutathione biosynthesis. *Free Radic Biol Med.* 44, 2002-12.
- Cousins RJ, Blanchard RK, Popp MP, Liu L, Cao J, Moore JB, Green CL. (2003). A global view of the selectivity of zinc deprivation and excess on genes expressed in human THP-1 mononuclear cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 6952-7.
- Cousins RJ, Leinart AS. (1988a). Tissue-specific regulation of zinc metabolism and metallothionein genes by interleukin-1. *Faseb J.* 2, 2884-90.
- Cousins RJ, Leinart AS. (1988b). Tissue-specific regulation of zinc metabolism and metallothionein genes by interleukin 1. *Faseb J.* 2, 2884-90.
- Cousins RJ, McMahon RJ. (2000). Integrative aspects of zinc transporters. *J Nutr.* 130, 1384S-7S.
- Cuevas LE, Koyanagi A. (2005). Zinc and infection: a review. *Ann Trop Paediatr.* 25, 149-60.
- Cunningham JJ, Lydon MK, Briggs SE, DeCheke M. (1991). Zinc and copper status of severely burned children during TPN. *J Am Coll Nutr.* 10, 57-62.

- Cuthbertson DP, Fell GS, Smith CM, Tilstone WJ. (1972). Metabolism after injury. I. Effects of severity, nutrition, and environmental temperature on protein potassium, zinc, and creatine. *Br J Surg.* 59, 926-31.
- Cynober L, Bargues L, Berger MM, Carsin H, Chiolero R, Garrel D, Gaucher S, Manelli J-C, Pernet P, Wassermann D. (2005). Nutritional recommendations for severe burn victims. *Nutrition Clinique et Métabolisme.* 19, 166-94.
- Daryani R, LaLonde C, Zhu D, Weidner M, Knox J, Demling RH. (1990). Effect of endotoxin and a burn injury on lung and liver lipid peroxidation and catalase activity. *J Trauma.* 30, 1330-4.
- Davis CD, Klevay LM, Milne DB, Nielsen FH. (1998a). Extracellular superoxide dismutase activity: a promising indicator of zinc status in humans. *Faseb J.* 12, A346.
- Davis SR, McMahon RJ, Cousins RJ. (1998b). Metallothionein knockout and transgenic mice exhibit altered intestinal processing of zinc with uniform zinc-dependent zinc transporter-1 expression. *J Nutr.* 128, 825-31.
- Davis SR, Samuelson DA, Cousins RJ. (2001). Metallothionein expression protects against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity, but overexpression and dietary zinc supplementation provide no further protection in metallothionein transgenic and knockout mice. *J Nutr.* 131, 215-22.
- de Haan KE, de Goeij JJ, van den Hamer CJ, Boxma H, de Groot CJ. (1992). Changes in zinc metabolism after burns: observations, explanations, clinical implications. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis.* 6, 195-201.
- DelMaestro RF, Thaw HH, Bjork J. (1980). Free Radicals as mediators of tissue injury. *Acta Physiol Scand.* 492, 43.
- Demling R, Ikegami K, Lalonde C. (1995). Increased lipid peroxidation and decreased antioxidant activity correspond with death after smoke exposure in the rat. *J Burn Care Rehabil.* 119, 340-8.
- Demling R, Lalonde C. (1990a). Early burn excision attenuates the postburn lung and systemic response to endotoxin. *Surgery.* 107, 85-93.
- Demling RH, Lalonde C. (1990b). Systemic lipid peroxidation and inflammation induced by thermal injury persists into the post-resuscitation period. *J Trauma.* 30, 69-74.
- Demling RH, Seigne P. (2000). Metabolic management of patients with severe burns. *World J Surg.* 24, 673-80.
- Ding HQ, Zhou BJ, Liu L, Cheng S. (2002). Oxidative stress and metallothionein expression in the liver of rats with severe thermal injury. *Burns.* 28, 215-21.
- DiSilvestro RA. (2000). Zinc in relation to diabetes and oxidative disease. *J Nutr.* 130, 1509S-11S.
- DiSilvestro RA, Carlson GP. (1994). Effects of mild zinc deficiency, plus or minus acute phase response, on CCl<sub>4</sub> hepatotoxicity. *Free Radic Biol Med.* 16, 57-61.
- Dobrian A, Simionescu M. (1995). Irreversibly glycated albumin alters the physico-chemical characteristics of low density lipoproteins of normal and diabetic subjects. *Biochim Biophys Acta.* 1270, 26-35.
- Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. (1971). Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta.* 31, 87-96.



- Dreosti IE. (2001). Zinc and the gene. *Mutat Res.* 475, 161-7.
- Drueke T, Gairard A, Guegen L, Hercberg S, Mareschi JP. (1986). Minéraux en alimentation humaine. *Cah Nutr Diét.* 5, 339-42.
- Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. (2001). Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest.* 108, 1341-8.
- Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M. (2000). Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 12222-6.
- Dudek EJ, Peak JG, Roth RM, Peak MJ. (1993). Isolation of V79 fibroblast cell lines containing elevated metallothionein levels that have increased resistance to the cytotoxic effects of ultraviolet-A radiation. *Photochem Photobiol.* 58, 836-40.
- Dufner-Beattie J, Kuo YM, Gitschier J, Andrews GK. (2004). The adaptive response to dietary zinc in mice involves the differential cellular localization and zinc regulation of the zinc transporters ZIP4 and ZIP5. *J Biol Chem.* 279, 49082-90.
- Dufner-Beattie J, Langmade SJ, Wang F, Eide D, Andrews GK. (2003a). Structure, function, and regulation of a subfamily of mouse zinc transporter genes. *J Biol Chem.* 278, 50142-50.
- Dufner-Beattie J, Wang F, Kuo YM, Gitschier J, Eide D, Andrews GK. (2003b). The acrodermatitis enteropathica gene ZIP4 encodes a tissue-specific, zinc-regulated zinc transporter in mice. *J Biol Chem.* 278, 33474-81.
- Dunn MA, Blalock TL, Cousins RJ. (1987). Metallothionein. *Proc Soc Exp Biol Med.* 185, 107-19.
- Dunn MF. (2005). Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer -- a review. *Biometals.* 18, 295-303.
- Durnam DM, Palmiter RD. (1981). Transcriptional regulation of the mouse metallothionein-I gene by heavy metals. *J Biol Chem.* 256, 5712-6.
- Duzguner V, Kaya S. (2007). Effect of zinc on the lipid peroxidation and the antioxidant defense systems of the alloxan-induced diabetic rabbits. *Free Radic Biol Med.* 42, 1481-6.
- Echinard C, Lartarget J. (1993). *Les brûlures*. Paris: Masson.
- Eide DJ. (2001). Functional genomics and metal metabolism. *Genome Biol.* 2, REVIEWS1028.
- Eide DJ. (2004). The SLC39 family of metal ion transporters. *Pflugers Arch.* 447, 796-800.
- El Yazigi A, Hannan N, Raines D. (1993). Effect of diabetic state and related disorders on the urinary excretion of magnesium and zinc in patients. *Diabetes Res.* 22, 67-75.
- Esen Gursel F, Tekeli SK. (2009). The effects of feeding with different levels of zinc and chromium on plasma thiobarbituric acid reactive substances and antioxidant enzymes in rats. *Pol J Vet Sci.* 12, 35-9.
- Fang YZ, Yang S, Wu G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* 18, 872-9.

- Fantone JC, Ward PA. (1982). Role of oxygen derived free radicals and metabolites in leucocyte dependent inflammatory reactions. *Am J Physiol.* 107, 397.
- Faure P, Barclay D, Joyeux-Faure M, Halimi S. (2007). Comparison of the effects of zinc alone and zinc associated with selenium and vitamin E on insulin sensitivity and oxidative stress in high-fructose-fed rats. *J Trace Elem Med Biol.* 21, 113-9.
- Faure P, Bonnefont-Rousselot D. (2005). Stress oxydant, diabète sucré et produits de glycation avancée. In J Delattre, JL Beaudoux, D Bonnefont-Rousselot eds. *Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques.*; pp. 353-76. Paris: Lavoisier.
- Faure P, Lafond JL. (1995). Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In AE Favier, J Cadet, M Kalnyanaraman, M Fontecave, JL Pierre eds. *Analysis of free radicals in biological systems.*; pp. 237-48. Birkäuser, Basel, Boston, Berlin.
- Faure P, Roussel A, Coudray C, Richard MJ, Halimi S, Favier A. (1992). Zinc and insulin sensitivity. *Biol Trace Elem Res.* 32, 305-10.
- Faure P, Roussel AM, Martinie M, Osman M, Favier A, Halimi S. (1991). Insulin sensitivity in zinc-depleted rats: assessment with the euglycaemic hyperinsulinic clamp technique. *Diabete Metab.* 17, 325-31.
- Favier A. (1995). Zinc-ligand interactions and oxygen free radicals formation in Handbook on metal-ligand interactions in biological fluids. In G Berthon ed. *Bioinorganic chemistry*; pp. 876-87. New York: Marcel Dekker.
- Favier A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique.* 108-15.
- FDA. (2000). Parenteral multivitamin products: Drugs for human use: drug efficacy study implementation: amendment *Fed Reg*; pp. 65-77. Food and Drug Administration.
- Feillet-Coudray C, Meunier N, Bayle D, Brandolini-Bunlon M, Andriollo-Sanchez M, O'Connor JM, Maiani G, Roussel AM, Mazur A, Coudray C. (2006). Effect of zinc supplementation on in vitro copper-induced oxidation of low-density lipoproteins in healthy French subjects aged 55-70 years: the Zenith Study. *Br J Nutr.* 95, 1134-42.
- Fernandez MA, O'Dell BL. (1983). Effect of zinc deficiency on plasma glutathione in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 173, 564-7.
- Fernandez-Madrid P, Prasad AS, Oberleas D. (1976). Zinc in collagen metabolism. In AS Prasad, D Oberleas eds. *Zinc and Copper*; pp. 257-65. New York: Academic Press.
- Festa MD, Anderson HL, Dowdy RP, Eilersieck MR. (1985). Effect of zinc intake on copper excretion and retention in men. *Am J Clin Nutr.* 41, 285-92.
- Fischer PW, Giroux A, L'Abbe MR. (1984). Effect of zinc supplementation on copper status in adult man. *Am J Clin Nutr.* 40, 743-6.
- Forman HJ, Fridovich I. (1973). On the stability of bovine superoxide dismutase. The effects of metals. *J Biol Chem.* 248, 2645-9.
- Fraker P, King L. (1998). Changes in regulation of lymphopoiesis and myelopoiesis in the zinc-deficient mouse. *Nutr Rev.* 56, S65-9.

- Fraker PJ, King LE, Laakko T, Vollmer TL. (2000). The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. *J Nutr.* 130, 1399S-406S.
- Freeland-Graves JH, Friedman BJ, Han WH, Shorey RL, Young R. (1982). Effect of zinc supplementation on plasma high-density lipoprotein cholesterol and zinc. *Am J Clin Nutr.* 35, 988-92.
- Fridlyand LE, Philipson LH. (2004). Does the glucose-dependent insulin secretion mechanism itself cause oxidative stress in pancreatic B-cells. *Diabetes.* 53, 1942-8.
- Gaither LA, Eide DJ. (2000). Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. *J Biol Chem.* 275, 5560-4.
- Gaither LA, Eide DJ. (2001a). Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals.* 14, 251-70.
- Gaither LA, Eide DJ. (2001b). The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells. *J Biol Chem.* 276, 22258-64.
- Gamliel Z, DeBiasse MA, Demling RH. (1996). Essential microminerals and their response to burn injury. *J Burn Care Rehabil.* 17, 264-72.
- Gibson RS, Scythes CA. (1982). Trace element intakes of women. *Br J Nutr.* 48, 241-8.
- Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP. (1988). Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabete Metab.* 14, 25-30.
- Giroux E, Schechter PJ, Schoun J, Sjoerdsma A. (1977). Reduced binding of added zinc in serum of patients with decompensated hepatic cirrhosis. *Eur J Clin Invest.* 7, 71-3.
- Gomez-Garcia A, Hernandez-Salazar E, Gonzalez-Ortiz M, Martinez-Abundis E. (2006). [Effect of oral zinc administration on insulin sensitivity, leptin and androgens in obese males]. *Rev Med Chil.* 134, 279-84.
- Gonzalez RG, Barnett P, Aguayo J, Cheng HM, Chylack LT, Jr. (1984). Direct measurement of polyol pathway activity in the ocular lens. *Diabetes.* 33, 196-9.
- Goodwin JS, Hunt WC, Hooper P, Garry PJ. (1985). Relationship between zinc intake, physical activity, and blood levels of high-density lipoprotein cholesterol in a healthy elderly population. *Metabolism.* 34, 519-23.
- Gordon T, Chen LC, Fine JM, Schlesinger RB, Su WY, Kimmel TA, Amdur MO. (1992). Pulmonary effects of inhaled zinc oxide in human subjects, guinea pigs, rats, and rabbits. *Am Ind Hyg Assoc J.* 53, 503-9.
- Gore DC, Chinkes D, Heggors J, Herndon DN, Wolf SE, Desai M. (2001). Association of hyperglycemia with increased mortality after severe burn injury. *J Trauma.* 51, 540-4.
- Gore DC, Wolf SE, Herndon DN, Wolfe RR. (2002). Relative influence of glucose and insulin on peripheral amino acid metabolism in severely burned patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 26, 271-7.
- Gosling P, Rothe HM, Sheehan TM, Hubbard LD. (1995). Serum copper and zinc concentrations in patients with burns in relation to burn surface area. *J Burn Care Rehabil.* 16, 481-6.

- Greene DA, Stevens MJ. (1996). The sorbitol-osmotic and sorbitol redox hypotheses. *Diabetes mellitus*. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Grider A, Mouat MF, Scrimgeour AG. (2007). Consumption of a moderately Zn-deficient and Zn-supplemented diet affects soluble protein expression in rat soleus muscle. *J Nutr Biochem*. 18, 753-9.
- Guffanti AA, Wei Y, Rood SV, Krulwich TA. (2002). An antiport mechanism for a member of the cation diffusion facilitator family: divalent cations efflux in exchange for K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup>. *Mol Microbiol*. 45, 145-53.
- Guichardan M, Valette-Talbi L, Cavadini C, Crozier G, Berger M. (1994). Malondialdehyde measurement in urine. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 665, 112-6.
- Guo Z, Li L, Zhao L. (1997). [Changes in contents of Zn, Cu, Fe, Ca, Mg in serum, urine and blister fluid after burn injury]. *Zhonghua Zheng Xing Shao Shang Wai Ke Za Zhi*. 13, 195-8.
- Guo Z, Li L, Zhao L. (2000). [The clinical and experimental study on postburn metabolic characteristics of zinc and its influence on copper, iron and calcium]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 16, 286-8.
- Gurnee CM, Drobatz KJ. (2007). Zinc intoxication in dogs: 19 cases (1991-2003). *J Am Vet Med Assoc*. 230, 1174-9.
- Gutteridge JM, Stocks J. (1981). Ceruloplasmin: physiologic and pathologic perspectives. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci*. 13, 257-329.
- Haase H, Maret W. (2003). Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin/insulin-like growth factor-1 signaling. *Exp Cell Res*. 291, 289-98.
- Haase H, Maret W. (2005). Protein tyrosine phosphatases as targets of the combined insulinomimetic effects of zinc and oxidants. *Biometals*. 18, 333-8.
- Hambidge KM, Casey CE, Krebs NF. (1986). Zinc. In W Mertz ed. *Trace elements in human and animal nutrition*. 5th ed.; pp. 1-137. Orlando: Academic Press.
- Hamdi EA. (1969). Chronic exposure to zinc of furnace operators in a brass foundry. *Br J Ind Med*. 26, 126-34.
- Harley CB, Menon CR, Rachubinski RA, Nieboer E. (1989). Metallothionein mRNA and protein induction by cadmium in peripheral-blood leucocytes. *Biochem J*. 262, 873-9.
- Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Horning B, Drexler H. (2003). Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am j Cardiol*. 91(suppl), 7A-11A.
- Haycock JW, Ralston DR, Morris B, Freedlander E, MacNeil S. (1997). Oxidative damage to protein and alterations to antioxidant levels in human cutaneous thermal injury. *Burns*. 23, 533-40.
- Hennig B, Meerarani P, Toborek M, McClain CJ. (1999a). Antioxidant-like properties of zinc in activated endothelial cells. *J Am Coll Nutr*. 18, 152-8.
- Hennig B, Meerarani P, Toborek M, McClain CJ. (1999b). Antioxydant-like properties of zinc in activated endothelial cells. *J Am Coll Nutr*. 18, 152-8.
- Herbein G, Varin A, Fulop T. (2006). NF-kappaB, AP-1, Zinc-deficiency and aging. *Biogerontology*. 7, 409-19.

- Heuchel R, Radtke F, Georgiev O, Stark G, Aguet M, Schaffner W. (1994). The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *Embo J.* 13, 2870-5.
- Heydon JL, Kagan AN. (1990). Metal fume fever. *N Z Med J.* 103, 52.
- Hidalgo MC, Exposito A, Palma JM, de la Higuera M. (2002). Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int J Biochem Cell Biol.* 34, 183-93.
- Hiramatsu M, Izawa Y, Hagihara M, Nishigaki I, Yagi K. (1984). Serum lipid peroxide levels of patients suffering from thermal injury. *Burns Incl Therm Inj.* 11, 111-6.
- Hirano T, Murakami M, Fukada T, Nishida K, Yamasaki S, Suzuki T. (2008). Roles of Zinc and Zinc Signaling in Immunity: Zinc as an Intracellular Signaling Molecule. *Adv Immunol.* 97C, 149-76.
- Hjortso E, Qvist J, Bud MI, Thomsen JL, Andersen JB, Wiberg-Jorgensen F, Jensen NK, Jones R, Reid LM, Zapol WM. (1988). ARDS after accidental inhalation of zinc chloride smoke. *Intensive Care Med.* 14, 17-24.
- Ho E, Ames BN. (2002). Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFkappa B, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 16770-5.
- Ho E, Courtemanche C, Ames BN. (2003). Zinc deficiency induces oxidative DNA damage and increases p53 expression in human lung fibroblasts. *J Nutr.* 133, 2543-8.
- Ho E, Quan N, Tsai YH, Lai W, Bray TM. (2001). Dietary zinc supplementation inhibits NFkB activation and protects against chemically induced diabetes in CD1 mice. *Exp Biol Med.* 226, 103-11.
- Ho LH, Ruffin RE, Murgia C, Lixin L, Krillis LA, Zalewski PD. (2004). Labile zinc and zinc transporter ZnT4 in mast cell granules : role in regulation of caspase activation and NFkB translocation. *J Immunol.* 172, 7750-60.
- Hoffman HN, 2nd, Phyllyk RL, Fleming CR. (1988). Zinc-induced copper deficiency. *Gastroenterology.* 94, 508-12.
- Holden JM, Wolf WR, Mertz W. (1979). Zinc and copper in self-selected diets. *J Am Diet Assoc.* 75, 23-8.
- Holm C, Horbrand F, Mayr M, von Donnersmarck GH, Muhlbauer W. (2004). Acute hyperglycaemia following thermal injury: friend or foe? *Resuscitation.* 60, 71-7.
- Hong KH, Keen CL, Mizuno Y, Johnston KE, Tamura T. (2000). Effects of dietary zinc deficiency on homocysteine and folate metabolism in rats. *J Nutr Biochem.* 11, 165-9.
- Hooper PL, Visconti L, Garry PJ, Johnson GE. (1980). Zinc lowers high-density lipoprotein-cholesterol levels. *Jama.* 244, 1960-1.
- Horder M, Elser RC, Gerhardt W, Mathieu M, Sampson EJ. (1991). International Federation of Clinical Chemistry, Scientific Division Committee on Enzymes: approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 7. IFCC method for creatine kinase (ATP: creatine N-phosphotransferase, EC 2.7.3.2). *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 29, 435-56.

- Hosnuter M, Gurel A, Babuccu O, Armutcu F, Kargi E, Isikdemir A. (2004). The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns*. 30, 121-5.
- Hsu JM. (1977). Zinc deficiency and alterations of free amino acid levels in plasma, urine and skin extract. *Prog Clin Biol Res*. 14, 73-86.
- Huang L, Gitschier J. (1997). A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse. *Nat Genet*. 17, 292-7.
- Huber AM, Gershoff SN. (1973). Effect of zinc deficiency in rats on insulin release from the pancreas. *J Nutr*. 103, 1739-44.
- Hunt DR, Lane HW, Beesinger D, Gallagher K, Halligan R, Johnston D, Rowlands BJ. (1984). Selenium depletion in burn patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 8, 695-9.
- Huo TN, Fang RH, Wei YH. (1993). Changes in lipid peroxide levels in the plasma of patients with thermal skin injuries. *J Formos Med Assoc*. 92, 1034-9.
- Huse M, Eck MJ, Harrison SC. (1998). A Zn<sup>2+</sup> ion links the cytoplasmic tail of CD4 and the N-terminal region of Lck. *J Biol Chem*. 273, 18729-33.
- Ibs KH, Rink L. (2003). Zinc-altered immune function. *J Nutr*. 133, 1452S-6S.
- Ikezu T, Okamoto T, Yonezawa K, Tompkins RG, Martyn JA. (1997). Analysis of thermal injury-induced insulin resistance in rodents. Implication of postreceptor mechanisms. *J Biol Chem*. 272, 25289-95.
- Inoue K, Matsuda K, Itoh M, Kawaguchi H, Tomoike H, Aoyagi T, Nagai R, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T. (2002). Osteopenia and male-specific sudden cardiac death in mice lacking a zinc transporter gene, *Znt5*. *Hum Mol Genet*. 11, 1775-84.
- Irato P, Albergoni V. (2005). Interaction between copper and zinc in metal accumulation in rats with particular reference to the synthesis of induced-metallothionein. *Chem Biol Interact*. 155, 155-64.
- Jacob C, Maret W, Vallee BL. (1998). Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 3489-94.
- Jain SK, Palmer M. (1997). The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins. *Free Radic Biol Med*. 22, 593-6.
- Jeejeebhoy KN. (1984). Zinc and chromium in parenteral nutrition. *Bull N Y Acad Med*. 60, 118-24.
- Jemai H, Messaoudi I, Chaouch A, Kerkeni A. (2007). Protective effect of zinc supplementation on blood antioxidant defense system in rats exposed to cadmium. *J Trace Elem Med Biol*. 21, 269-73.
- Jenner A, Ren M, Rajendran R, Ning P, Huat BT, Watt F, Halliwell B. (2007). Zinc supplementation inhibits lipid peroxidation and the development of atherosclerosis in rabbits fed a high cholesterol diet. *Free Radic Biol Med*. 42, 559-66.
- Jenner P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 53, S26-S36.
- Jiang LJ, Maret W, Vallee BL. (1998). The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 3483-8.

- Jin LJ, Lalonde C, Demling RH. (1986). Lung dysfunction after thermal injury in relation to prostanoid and oxygen radical release. *J Appl Physiol.* 61, 103-12.
- Jing MY, Sun JY, Zi NT, Sun W, Qian LC, Weng XY. (2007). Effects of zinc on hepatic antioxidant systems and the mRNA expression levels assayed by cDNA microarrays in rats. *Ann Nutr Metab.* 51, 345-51.
- Kabu K, Yamasaki S, Kamimura D, Ito Y, Hasegawa A, Sato E, Kitamura H, Nishida K, Hirano T. (2006). Zinc is required for Fc epsilon RI-mediated mast cell activation. *J Immunol.* 177, 1296-305.
- Kambe T, Narita H, Yamaguchi-Iwai Y, Hirose J, Amano T, Sugiura N, Sasaki R, Mori K, Iwanaga T, Nagao M. (2002). Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic beta cells. *J Biol Chem.* 277, 19049-55.
- Kang HK, Kim DK, Lee BH, Om AS, Hong JH, Koh HC, Lee CH, Shin IC, Kang JS. (2001). Urinary N-acetyl-beta-D-glucosamidase and malondialdehyde as a markers of renal damage in burned patients. *J Korean Med Sci.* 16, 598-602.
- Kazacos EA, Van Vleet JF. (1989). Sequential ultrastructural changes of the pancreas in zinc toxicosis in ducklings. *Am J Pathol.* 134, 581-95.
- Kelleher SL, Lonnerdal B. (2002). Zinc transporters in the rat mammary gland respond to marginal zinc and vitamin A intakes during lactation. *J Nutr.* 132, 3280-5.
- Kenner KA, Anyanwu E, Olefsky JM, Kusari J. (1996). Protein-tyrosine phosphatase 1B is a negative regulator of insulin- and insulin-like growth factor-I-stimulated signaling. *J Biol Chem.* 271, 19810-6.
- Khlopovskaya EI, Budagov RS, Smoryzanova OA, Rott GM. (1997). Involvement of metallothioneins in regulation of macrophage activity after combined radiation and thermal injury. *Biochemistry (Mosc).* 62, 294-6.
- King JC, Keen CL. (1994). Zinc. In ME Shils, JA Olson, M Shike eds. *Modern nutrition in health and disease, eighth edition*; pp. 214-30. Philadelphia: Lea & Febiger.
- King LE, Osati-Ashtiani F, Fraker PJ. (2002). Apoptosis plays a distinct role in the loss of precursor lymphocytes during zinc deficiency in mice. *J Nutr.* 132, 974-9.
- Kirchgessner M, Roth HP. (1983). Nutritional influence of zinc activity of enzymes and hormones. *Metal ions in biological systems.*; pp. 363-414. New York: Marcel Dekker.
- Kirschke CP, Huang L. (2003). ZnT7, a novel mammalian zinc transporter, accumulates zinc in the Golgi apparatus. *J Biol Chem.* 278, 4096-102.
- Kitamura H, Morikawa H, Kamon H, Iguchi M, Hojyo S, Fukada T, Yamashita S, Kaisho T, Akira S, Murakami M, Hirano T. (2006). Toll-like receptor-mediated regulation of zinc homeostasis influences dendritic cell function. *Nat Immunol.* 7, 971-7.
- klevay LM. (1974). Interactions among dietary copper, zinc and the metabolism of cholesterol and phospholipids. In H WG, JW Suttie, HE Ganther, W Mertz eds. *Trace elements metabolism in animals*; pp. 553-6. Baltimore: University Park Press.
- Koh JY, Suh SW, Gwag BJ, He YY, Hsu CY, Choi DW. (1996). The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science.* 272, 1013-6.

- Kondoh M, Inoue Y, Atagi S, Futakawa N, Higashimoto M, Sato M. (2001). Specific induction of metallothionein synthesis by mitochondrial oxidative stress. *Life Sci.* 69, 2137-46.
- Konukoglu D, Turhan MS, Ercan M, Serin O. (2004). Relationship between plasma leptin and zinc levels and the effect of insulin and oxidative stress on leptin levels in obese diabetic patients. *J Nutr Biochem.* 15, 757-60.
- Koukay N, Laporte F, Favier A. (1987). Zinc et radicaux libres (étude *in vitro*). In A Favier, J Arnaud, H Faure eds. *Le zinc en médecine et biologie*; pp. 64-8. Paris: Editions Médicales Internationales.
- Kumar R, Seth RK, Sekhon MS, Bhargava JS. (1995). Serum lipid peroxide and other enzyme levels of patients suffering from thermal injury. *Burns.* 21, 96-7.
- Kury S, Dreno B, Bezieau S, Giraudet S, Kharfi M, Kamoun R, Moisan JP. (2002). Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. *Nat Genet.* 31, 239-40.
- Lafargue P, Couture JC, Monteil R, Guilbaud J, Saliou L. (1976). [Evolution of serum copper and zinc levels in burn patients (author's transl)]. *Clin Chim Acta.* 66, 181-8.
- Laight LW, Desai KM, Gopaul NK, Anggard EE, Carrier MJ. (1999). Pro-oxidant challenge in vivo provokes the onset of NIDDM in the insulin resistant obese Zucker rat. *br J Pharmacol.* 128, 269-71.
- Langmade SJ, Ravindra R, Daniels PJ, Andrews GK. (2000). The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J Biol Chem.* 275, 34803-9.
- Lansdown AB. (1991). Interspecies variations in response to topical application of selected zinc compounds. *Food Chem Toxicol.* 29, 57-64.
- Larson DL, Maxwell R, Abston S, Dobrkovsky M. (1970). Zinc deficiency in burned children. *Plast Reconstr Surg.* 46, 13-21.
- Latha B, Babu M. (2001). The involvement of free radicals in burn injury: a review. *Burns.* 27, 309-17.
- Lazo JS, Kondo Y, Dellapiazza D, Michalska AE, Choo KH, Pitt BR. (1995). Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in metallothionein I and II genes. *J Biol Chem.* 270, 5506-10.
- Leblanc JC, Guerin T, Noel L, Calamassi-Tran G, Volatier JL, Verger P. (2005). Dietary exposure estimates of 18 elements from the 1st French Total Diet Study. *Food Addit Contam.* 22, 624-41.
- Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. (1996). Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med.* 20, 463-6.
- Li L, Guo Z, Zhao L. (1998a). [Effects of supplement Zn on levels of Zn in serum, growth hormone and hydroxyproline]. *Zhonghua Zheng Xing Shao Shang Wai Ke Za Zhi.* 14, 425-8.
- Li L, Guo Z, Zhao L. (1999). [The effects of zinc on liver metallothionein in scalded rats]. *Zhonghua Zheng Xing Shao Shang Wai Ke Za Zhi.* 15, 363-5.
- Li Q, Hu N, Daggett MA, Chu WA, Bittel D, Johnson JA, Andrews GK. (1998b). Participation of upstream stimulator factor (USF) in cadmium-induction of the mouse metallothionein-I gene. *Nucleic Acids Res.* 26, 5182-9.



- Lichten LA, Cousins RJ. (2009). Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annu Rev Nutr.* 29, 153-76.
- Liuzzi JP, Blanchard RK, Cousins RJ. (2001). Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. *J Nutr.* 131, 46-52.
- Liuzzi JP, Bobo JA, Cui L, McMahon RJ, Cousins RJ. (2003). Zinc transporters 1, 2 and 4 are differentially expressed and localized in rats during pregnancy and lactation. *J Nutr.* 133, 342-51.
- Liuzzi JP, Bobo JA, Lichten LA, Samuelson DA, Cousins RJ. (2004a). Responsive transporter genes within the murine intestinal-pancreatic axis form a basis of zinc homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 14355-60.
- Liuzzi JP, Cousins RJ. (2004b). Mammalian zinc transporters. *Annu Rev Nutr.* 24, 151-72.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25, 402-8.
- Llobet JM, Domingo JL, Colomina MT, Mayayo E, Corbella J. (1988). Subchronic oral toxicity of zinc in rats. *Bull Environ Contam Toxicol.* 41, 36-43.
- Lonnerdal B. (2000). Dietary factors influencing zinc absorption. *J Nutr.* 130, 1378S-83S.
- Lu JX, Combs GF, Jr., Fleet JC. (1990). Time-course studies of pancreatic exocrine damage induced by excess dietary zinc in the chick. *J Nutr.* 120, 389-97.
- Lund CC, Browder JR. (1944). An estimation of areas of burns. *Surg Gynecol Obstet.* 79, 351-2.
- Maita K, Hirana M, Mitsumori K. (1981). Subacute toxicity studies with zinc sulfate in mice and rats. *J Pest Sci.* 6, 327-36.
- Makarova KS, Aravind L, Koonin EV. (2000). A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and Chlamydia pneumoniae. *Trends Biochem Sci.* 25, 50-2.
- Manary MJ, Hotz C, Krebs NF, Gibson RS, Westcott JE, Broadhead RL, Hambidge KM. (2002). Zinc homeostasis in Malawian children consuming a high-phytate, maize-based diet. *Am J Clin Nutr.* 75, 1057-61.
- Manning DL, Daly RJ, Lord PG, Kelly KF, Green CD. (1988). Effects of oestrogen on the expression of a 4.4 kb mRNA in the ZR-75-1 human breast cancer cell line. *Mol Cell Endocrinol.* 59, 205-12.
- Maret W. (1994). Oxidative metal release from metallothionein via zinc-thiol/disulfide interchange. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 237-41.
- Maret W. (1995). Metallothionein/disulfide interactions, oxidative stress, and the mobilization of cellular zinc. *Neurochem Int.* 27, 111-7.
- Maret W. (2003). Cellular zinc and redox states converge in the metallothionein/thionein pair. *J Nutr.* 133, 1460S-2S.
- Maret W, Jacob C, Vallee BL, Fischer EH. (1999). Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 1936-40.

- Mariani E, Mangialasche F, Feliziani FT, Cecchetti R, Malavolta M, Bastiani P, Baglioni M, Dedoussis G, Fulop T, Herbein G, Jajte J, Monti D, Rink L, Mocchegiani E, Mecocci P. (2008). Effects of zinc supplementation on antioxidant enzyme activities in healthy old subjects. *Exp Gerontol.* 43, 445-51.
- Markant A, Pallauf J. (1996). Metallothionein and zinc as potential antioxidants in radical-induced lipid peroxidation in cultured hepatocytes. *J Trace Elem Med Biol.* 10, 88-95.
- Marrs TC, Colgrave HF, Edginton JA, Brown RF, Cross NL. (1988). The repeated dose toxicity of a zinc oxide/hexachloroethane smoke. *Arch Toxicol.* 62, 123-32.
- Martin A. (2001). Apports nutritionnels conseillés pour la population française. Paris. Technique et Documentation.
- Martinez-Montemayor MM, Hill GM, Raney NE, Rilington VD, Tempelman RJ, Link JE, Wilkinson CP, Ramos AM, Ernst CW. (2008). Gene expression profiling in hepatic tissue of newly weaned pigs fed pharmacological zinc and phytase supplemented diets. *BMC Genomics.* 9, 421.
- Mayers I, Johnson D. (1998). The nonspecific inflammatory response to injury. *Can J Anaesth.* 45, 871-9.
- McConnell KP, Hsu JM, Herrman JL, Anthony WL. (1974). Parallelism between sulfur and selenium amino acids in protein synthesis in the skin of zinc-deficient rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 145, 970-4.
- McMahon RJ, Cousins RJ. (1998a). Mammalian zinc transporters. *J Nutr.* 128, 667-70.
- McMahon RJ, Cousins RJ. (1998b). Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 4841-6.
- Mecocci P, Polidori MC, Troiano L, Cherubini A, Cecchetti R, Pini G, Straatman M, Monti D, Stahl W, Sies H, Franceschi C, Senin U. (2000). Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radic Biol Med.* 28, 1243-8.
- Medici V, Sturniolo GC, Santon A, D'Inca R, Bortolami M, Cardin R, Basso D, Albergoni V, Irato P. (2005). Efficacy of zinc supplementation in preventing acute hepatitis in Long-Evans Cinnamon rats. *Liver Int.* 25, 888-95.
- Mercier C, Blond MH. (1999). Épidémiologie et prévention de la brûlure de l'enfant; Epidemiology and prevention of burns in infants and children. *Annales de Pédiatrie.* 46, 301-10.
- Miceli MV, Tate DJ, Jr., Alcock NW, Newsome DA. (1999). Zinc deficiency and oxidative stress in the retina of pigmented rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40, 1238-44.
- Michalczyk AA, Allen J, Blomeley RC, Ackland ML. (2002). Constitutive expression of hZnT4 zinc transporter in human breast epithelial cells. *Biochem J.* 364, 105-13.
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond).* 84, 407-12.
- Milne DB, Ralston NV, Wallwork JC. (1985). Zinc content of cellular components of blood: methods for cell separation and analysis evaluated. *Clin Chem.* 31, 65-9.

- Moore JB, Blanchard RK, McCormack WT, Cousins RJ. (2001). cDNA array analysis identifies thymic LCK as upregulated in moderate murine zinc deficiency before T-lymphocyte population changes. *J Nutr.* 131, 3189-96.
- Morellini NM, Giles NL, Rea S, Adcroft KF, Falder S, King CE, Dunlop SA, Beazley LD, West AK, Wood FM, Fear MW. (2008). Exogenous metallothionein-IIA promotes accelerated healing after a burn wound. *Wound Repair Regen.* 16, 682-90.
- Moser PB, Borel J, Majerus T, Anderson RA. (1985). Serum zinc and urinary zinc excretion of trauma patients. *Nutrition Research.* 5, 253-61.
- Mueller EJ, Seger DL. (1985). Metal fume fever--a review. *J Emerg Med.* 2, 271-4.
- Muller MJ, Herndon DN. (1994). The challenges of burns. *Lancet.* 343, 216-20.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 Pt 1, 263-73.
- Nakagawa I, Suzuki M, Yanagiya T, Imura N, Naganuma A. (1995). Effect of glutathione depletion on metallothionein synthesis induced by paraquat in mice. *Tohoku J Exp Med.* 177, 249-62.
- Naziroglu M, Kokcam I, Yilmaz S. (2003). Beneficial effects of intraperitoneally administered alphatocopheryl acetate on the levels of lipid peroxide and activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in skin, blood and liver of thermally injured guinea pigs. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 16, 36-45.
- Noel L, Leblanc JC, Guerin T. (2003). Determination of several elements in duplicate meals from catering establishments using closed vessel microwave digestion with inductively coupled plasma mass spectrometry detection: estimation of daily dietary intake. *Food Addit Contam.* 20, 44-56.
- Oberleas D, Prasad AS. (1976). Factors affecting zinc homeostasis. In AS Prasad ed. *Zinc and Copper*; pp. 155-62. New York: Academic Press.
- Ohno H, Yamashita K, Doi R, Yamamura K, Kondo T, Taniguchi N. (1985). Exercise-induced changes in blood zinc and related proteins in humans. *J Appl Physiol.* 58, 1453-8.
- Osis D, Kramer L, Wiatrowski E, Spencer H. (1972). Dietary zinc intake in man. *Am J Clin Nutr.* 25, 582-8.
- Oteiza PI, Clegg MS, Zago MP, Keen CL. (2000). Zinc deficiency induces oxidative stress and AP-1 activation in 3T3 cells. *Free Radic Biol Med.* 28, 1091-9.
- Oteiza PI, Olin KL, Fraga CG, Keen CL. (1995). Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA in rat testes. *J Nutr.* 125, 823-9.
- Oteiza PL, Olin KL, Fraga CG, Keen CL. (1996). Oxidant defense systems in testes from zinc-deficient rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 213, 85-91.
- Paglia DE, Valentine WN. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 70, 158-69.
- Palmiter RD, Cole TB, Findley SD. (1996a). ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. *Embo J.* 15, 1784-91.

- Palmiter RD, Cole TB, Quaife CJ, Findley SD. (1996b). ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 14934-9.
- Palmiter RD, Findley SD. (1995). Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *Embo J.* 14, 639-49.
- Palmiter RD, Findley SD, Whitmore TE, Durnam DM. (1992). MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 6333-7.
- Palmiter RD, Huang L. (2004). Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflugers Arch.* 447, 744-51.
- Patterson WP, Winkelmann M, Perry MC. (1985). Zinc-induced copper deficiency: megamineral sideroblastic anemia. *Ann Intern Med.* 103, 385-6.
- Pauwels M, van Weyenbergh J, Soumillion A, Proost P, De Ley M. (1994). Induction by zinc of specific metallothionein isoforms in human monocytes. *Eur J Biochem.* 220, 105-10.
- Peck MD. (2001). Initial nutritional support in burn patients: American Burn Association Guidelines. *J Burn Care Rehabil.* 22, 595-665.
- Peinnequin A, Mouret C, Birot O, Alonso A, Mathieu J, Clarencon D, Agay D, Chancerelle Y, Multon E. (2004). Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol.* 5, 3.
- Pelus E, Arnaud J, Ducros V, Roussel A. (1996). Trace elements intakes in a group of French males using duplicate diets technique. *Int J Food Sci Nutr.* 45, 63-70.
- Penkowa M, Giralt M, Thomsen PS, Carrasco J, Hidalgo J. (2001). Zinc or copper deficiency-induced impaired inflammatory response to brain trauma may be caused by the concomitant metallothionein changes. *J Neurotrauma.* 18, 447-63.
- Pennington JA. (1996). Intakes of minerals from diets and foods: is there a need for concern? *J Nutr.* 126, 2304S-8S.
- Pfaffl MW, Gerstmayer B, Bosio A, Windisch W. (2003). Effect of zinc deficiency on the mRNA expression pattern in liver and jejunum of adult rats: monitoring gene expression using cDNA microarrays combined with real-time RT-PCR. *J Nutr Biochem.* 14, 691-702.
- Piao F, Yokoyama K, Ma N, Yamauchi T. (2003). Subacute toxic effects of zinc on various tissues and organs of rats. *Toxicol Lett.* 145, 28-35.
- Pochon JP, Klöti J. (1979). Zinc and copper replacement therapy in children with deep burns. *Burns.* 5, 123-6.
- Podeur E. (2007). Circulaire DHOS/O4 no 2007-391 du 29 octobre 2007 relative aux activités de soins de traitement des grands brûlés. Direction de l'hospitalisation et de l'organisation des soins.
- Poutney DL, Kägi JH, Vasak M. (1995). Metallothionein *Handbook of metal-ligand interaction in biological fluids.*; pp. 431-42. New York: Marcel Dekker.
- Powell SR. (2000). The antioxidant properties of zinc. *J Nutr.* 130, 1447S-54S.
- Prasad AS. (2007a). Zinc: mechanisms of host defense. *J Nutr.* 137, 1345-9.

- Prasad AS. (2008a). Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Exp Gerontol.* 43, 370-7.
- Prasad AS. (2008b). Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. *Mol Med.* 14, 353-7.
- Prasad AS, Bao B, Beck FW, Kucuk O, Sarkar FH. (2004). Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radic Biol Med.* 37, 1182-90.
- Prasad AS, Bao B, Beck FW, Sarkar B. (2002). Zinc enhances the expression of interleukin-2 and interleukin-2 receptor in HUT-78 cells by way of NF-kB activation. *J Lab Clin Med.* 140, 272-89.
- Prasad AS, Bao B, Beck FW, Sarkar FH. (2001). Zinc activates NF-kB in HUT-78 cells. *J Lab Clin Med.* 138, 250-6.
- Prasad AS, Beck FW, Bao B, Fitzgerald JT, Snell DC, Steinberg JD, Cardozo LJ. (2007b). Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. *Am J Clin Nutr.* 85, 837-44.
- Prasad AS, Brewer GJ, Schoomaker EB, Rabbani P. (1978). Hypocupremia induced by zinc therapy in adults. *Jama.* 240, 2166-8.
- Prasad AS, Meftah S, Abdallah J, Kaplan J, Brewer GJ, Bach JF, Dardenne M. (1988). Serum thymulin in human zinc deficiency. *J Clin Invest.* 82, 1202-10.
- Preziosi P, Galan P, Herbeth B, Valeix P, Roussel AM, Malvy D, Paul-Dauphin A, Arnaud J, Richard MJ, Briancon S, Favier A, Hercberg S. (1998). Effects of supplementation with a combination of antioxidant vitamins and trace elements, at nutritional doses, on biochemical indicators and markers of the antioxidant system in adult subjects. *J Am Coll Nutr.* 17, 244-9.
- Prost AL, Bloc A, Hussy N, Derand R, Vivaudou M. (2004). Zinc is both an intracellular and extracellular regulator of KATP channel function. *J Physiol.* 559, 157-67.
- Qin F, Chen X, Ding H, Cheng S, Sun Y. (2002). [Protective effects of Zn-metallothionein on erythrocyte membrane of rats with severe scalding after delayed resuscitation]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 40, 222-4.
- Quaife CJ, Findley SD, Erickson JC, Froelick GJ, Kelly EJ, Zambrowicz BP, Palmiter RD. (1994). Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry.* 33, 7250-9.
- Quarterman J, Mills CF, Humphries WR. (1966). The reduced secretion of, and sensitivity to insulin in zinc-deficient rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 25, 354-8.
- Raffoul W, Berger EM. (2006). Les brûlures: de l'ébouillement à l'électrisation - définitions et traitement. *Forum Med Suisse.* 6, 243-50.
- Ranaldi G, Perozzi G, Truong-Tran A, Zalewski P, Murgia C. (2002). Intracellular distribution of labile Zn(II) and zinc transporter expression in kidney and MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 283, F1365-75.
- Reinhold JG, Faradji B, Tsmail Beigi F. (1976). Binding of zinc to fiber and other solids of wholemeal head. In AS Prasad ed. *Zinc and Copper*; pp. 163-80. New York: Academic Press.
- Reyes JG. (1996). Zinc transport in mammalian cells. *Am J Physiol.* 270, C401-10.

- Riazantseva NV, Novitskii VV, Riazantsev VP. (2000). Characterisation of peripheral erythron component in patients with localized themal burns. *Klin Lab Diagn.* 6, 23-33.
- Richard MJ, Guiraud P, Leccia MT, Beani JC, Favier A. (1993). Effect of zinc supplementation on resistance of cultured human skin fibroblasts toward oxidant stress. *Biol Trace Elem Res.* 37, 187-99.
- Richard MJ, Portal B, Meo J, Coudray C, Hadjian A, Favier A. (1992). Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. *Clin Chem.* 38, 704-9.
- Rink L, Kirchner H. (2000). Zinc-altered immune function and cytokine production. *J Nutr.* 130(5S Suppl), 1407S-11S.
- Ripa S, Ripa R. (1995). Zinc and immune function. *Minerva Med.* 86, 315-8.
- Ritter C, Andrades M, Guerreiro M, Zavaschi L, Gelain DP, Souza LF, Ribeiro CA, Clausell N, Menna-Barreto S, Moreira JC, Dal-Pizzol F. (2003). Plasma oxidative parameters and mortality in patients with severe burn injury. *Intensive Care Med.* 29, 1380-3.
- Roeschlau P, Bernt E, Gruber W. (1974). Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Z Klin Chem Klin Biochem.* 12, 226.
- Rogers EE, Eide DJ, Guerinot ML. (2000). Altered selectivity in an Arabidopsis metal transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 12356-60.
- Rossmann TG, Goncharova EI. (1998). Spontaneous mutagenesis in mammalian cells is caused mainly by oxidative events and can be blocked by antioxidants and metallothionein. *Mutat Res.* 402, 103-10.
- Roussel AM, Kerkeni A, Zouari N, Mahjoub S, Matheau JM, Anderson RA. (2003). Antioxidant effects of zinc supplementation in Tunisians with type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr.* 22, 316-21.
- Rutter GA. (2004). Visualising insulin secretion. The Minkowski lecture 2004. *Diabetologia.* 47, 1861-72.
- Sabatier PP. (2008). Zinc *Santé magazine.*
- Sabeh F, Baxter CR, Norton SJ. (1995). Skin burn injury and oxidative stress in liver and lung tissues of rabbit models. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 33, 323-8.
- Sabeh F, Hockberger P, Sayeed MM. (1998). Signaling mechanisms of elevated neutrophil O<sub>2</sub>-generation after burn injury. *Am J Physiol.* 274, R476-85.
- Sahin K, Smith MO, Onderci M, Sahin N, Gursu MF, Kucuk O. (2005). Supplementation of zinc from organic or inorganic source improves performance and antioxidant status of heat-distressed quail. *Poult Sci.* 84, 882-7.
- Sakaguchi S, Iizuka Y, Furusawa S, Ishikawa M, Satoh S, Takayanagi M. (2002). Role of Zn(2+) in oxidative stress caused by endotoxin challenge. *Eur J Pharmacol.* 451, 309-16.
- Samman S, Roberts DC. (1987). The effect of zinc supplements on plasma zinc and copper levels and the reported symptoms in healthy volunteers. *Med J Aust.* 146, 246-9.
- Sandstead HH. (1991). Zinc deficiency. A public health problem? *Am J Dis Child.* 145, 853-9.

- Sandstead HH. (1995). Requirements and toxicity of essential trace elements, illustrated by zinc and copper. *Am J Clin Nutr.* 61, 621S-4S.
- Sandstead HH, Lanier VC, Jr., Shephard GH, Gillespie DD. (1970). Zinc and wound healing. Effects of zinc deficiency and zinc supplementation. *Am J Clin Nutr.* 23, 514-9.
- Santos FX, Arroyo C, Garcia I, Blasco R, Obispo JM, Hamman C, Espejo L. (2000). Role of the mast cells in the pathogenesis of postburn inflammatory response: reactive oxygen species as mast cell stimulators. *Burns.* 26, 145-7.
- Sato M, Bremner I. (1993). Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic Biol Med.* 14, 325-37.
- Sayed MM. (1998). Neutrophil signaling alteration: an adverse inflammatory response after burn shock. *Medicina (B Aires).* 58, 386-92.
- Sazawal S, Black RE, Jalla S, Mazumdar S, Sinha A, Bhan MK. (1998). Zinc supplementation reduces the incidence of acute lower respiratory infections in infants and preschool children: a double-blind, controlled trial. *Pediatrics.* 102, 1-5.
- Schelenz RFW, Harmuth-Hoene AE. (1985). Dietary intakes of Zn,Fe,Cu and Se by adult females : a total study. In CF Mills, I Bremner, JK Chesters eds. *Trace elements in man and animals*; pp. 620-2: Commonwealth Agricultural Bureaux.
- Schmuck A, Roussel A, Arnaud J, Ducros V, Favier A, Franco A. (1996). Analysed dietary intakes and plasma concentrations of zinc, copper and selenium and related metalloenzymes activities in hospitalized elderly women. *J Am Coll Nutr.* 15, 462-70.
- Schott-Ohly P, Lgssiar A, Partke HJ, Hassan M, Friesen N, Gleichmann H. (2004). Prevention of spontaneous and experimentally induced diabetes in mice with zinc sulfate-enriched drinking water is associated with activation and reduction of NFkB and AP-1 in islets, respectively. *Exp Biol Med.* 229, 1177-85.
- Schroeder JJ, Cousins RJ. (1990). Interleukin-6 regulates metallothionein gene expression and zinc metabolism in hepatocyte monolayer cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 3137-41.
- Scott DA. (1934). Crystalline insulin. *Biochem J.* 28, 1592-602 1.
- Selmanpakoglu AN, Cetin C, Sayal A, Isimer A. (1994). Trace element (Al, Se, Zn, Cu) levels in serum, urine and tissues of burn patients. *Burns.* 20, 99-103.
- Sener G, Satyroglu H, Ozer Sehirli A, Kacmaz A. (2003). Protective effect of aqueous garlic extract against oxidative organ damage in a rat model of thermal injury. *Life Sci.* 73, 81-91.
- Seve M, Chimienti F, Devergnas S, Favier A. (2004). In silico identification and expression of SLC30 family genes: an expressed sequence tag data mining strategy for the characterization of zinc transporters' tissue expression. *BMC Genomics.* 5, 32.
- Seve M, Favier A, eds. (2002) *Métabolisme du zinc*: Encycl Méd-Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS).
- Shaheen AA, el-Fattah AA. (1995). Effect of dietary zinc on lipid peroxidation, glutathione, protein thiols levels and superoxide dismutase activity in rat tissues. *Int J Biochem Cell Biol.* 27, 89-95.
- Shakespeare PG. (1982). Studies on the serum levels of iron, copper and zinc and the urinary excretion of zinc after burn injury. *Burns Incl Therm Inj.* 8, 358-64.

- Shankar AH, Prasad AS. (1998). Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr.* 68, 447S-63S.
- Shen H, Oesterling E, Stromberg A, Toborek M, MacDonald R, Hennig B. (2008). Zinc deficiency induces vascular pro-inflammatory parameters associated with NF-kappaB and PPAR signaling. *J Am Coll Nutr.* 27, 577-87.
- Shenkin A. (2000). Micronutrients in the severely-injured patient. *Proc Nutr Soc.* 59, 451-6.
- Shirasawa S, Harada H, Furugaki K, Akamizu T, Ishikawa N, Ito K, Tamai H, Kuma K, Kubota S, Hiratani H, Tsuchiya T, Baba I, Ishikawa M, Tanaka M, Sakai K, Aoki M, Yamamoto K, Sasazuki T. (2004). SNPs in the promoter of a B cell-specific antisense transcript, SAS-ZFAT, determine susceptibility to autoimmune thyroid disease. *Hum Mol Genet.* 13, 2221-31.
- Sidhu P, Garg ML, Dhawan DK. (2005). Protective effects of zinc on oxidative stress enzymes in liver of protein-deficient rats. *Drug Chem Toxicol.* 28, 211-30.
- Sim DL, Yeo WM, Chow VT. (2002). The novel human HUEL (C4orf1) protein shares homology with the DNA-binding domain of the XPA DNA repair protein and displays nuclear translocation in a cell cycle-dependent manner. *Int J Biochem Cell Biol.* 34, 487-504.
- Simon SF, Taylor CG. (2001). Dietary zinc supplementation attenuates hyperglycemia in db/db mice. *Exp Biol Med (Maywood).* 226, 43-51.
- Smith MA, Rottkamp CA, Nunonura A, Raina AK, Perry G. (2000). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochem Bioph Acta.* 1502, 139-44.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150, 76-85.
- Spadoni S (2007) Intérêt des micronutriments pour lutter contre le stress oxydant chez le brûlé : Pratiques de supplémentation dans les centres de Traitements des Brûlés. LYON: Université Claude Bernard - LYON1.
- Starke-Reed PE, Oliver CN. (1989). Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch Biochem Biophys.* 275, 559-67.
- Straube EF, Schuster NH, Sinclair AJ. (1980). Zinc toxicity in the ferret. *J Comp Pathol.* 90, 355-61.
- Sun JY, Jing MY, Weng XY, Fu LJ, Xu ZR, Zi NT, Wang JF. (2005). Effects of dietary zinc levels on the activities of enzymes, weights of organs, and the concentrations of zinc and copper in growing rats. *Biol Trace Elem Res.* 107, 153-65.
- Suntres ZE, Lui EM. (2006). Antioxidant effect of zinc and zinc-metallothionein in the acute cytotoxicity of hydrogen peroxide in Ehrlich ascites tumour cells. *Chem Biol Interact.* 162, 11-23.
- Suzuki T, Ishihara K, Migaki H, Nagao M, Yamaguchi-Iwai Y, Kambe T. (2005). Two different zinc transport complexes of cation diffusion facilitator proteins localized in the secretory pathway operate to activate alkaline phosphatases in vertebrate cells. *J Biol Chem.* 280, 30956-62.
- Szczurek EI, Bjornsson CS, Taylor CG. (2001). Dietary zinc deficiency and repletion modulate metallothionein immunolocalization and concentration in small intestine and liver of rats. *J Nutr.* 131, 2132-8.



- Szuster-Ciesielska A, Plewka K, Daniluk J, Kandefor-Szerszen M. (2009). Zinc supplementation attenuates ethanol- and acetaldehyde-induced liver stellate cell activation by inhibiting reactive oxygen species (ROS) production and by influencing intracellular signaling. *Biochem Pharmacol.* 78, 301-14.
- Talke H, Schubert GE. (1965). [Enzymatic Urea Determination in the Blood and Serum in the Warburg Optical Test.]. *Klin Wochenschr.* 43, 174-5.
- Taper LJ, Hinnens ML, Ritchey SJ. (1980). Effects of zinc intake on copper balance in adult females. *Am J Clin Nutr.* 33, 1077-82.
- Tapiero H, Tew KD. (2003a). Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother.* 57, 399-411.
- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. (2003b). Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomed Pharmacother.* 57, 386-98.
- Taylor CG, Bettger WJ, Bray TM. (1988). Effect of dietary zinc or copper deficiency on the primary free radical defense system in rats. *J Nutr.* 118, 613-21.
- Taylor KM, Nicholson RI. (2003). The LZT proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters. *Biochim Biophys Acta.* 1611, 16-30.
- Taysi S, Cikman O, Kaya A, Demircan B, Gumustekin K, Yilmaz A, Boyuk A, Keles M, Akyuz M, Turkeli M. (2008). Increased Oxidant Stress and Decreased Antioxidant Status in Erythrocytes of Rats Fed with Zinc-deficient Diet. *Biol Trace Elem Res.*
- Tietz NW, Rinker AD, Shaw LM. (1983). IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes Part 5. IFCC method for alkaline phosphatase (orthophosphoric-monoester phosphohydrolase, alkaline optimum, EC 3.1.3.1). *J Clin Chem Clin Biochem.* 21, 731-48.
- Tobia MH, Zdanowicz MM, Wingertzahn MA, McHeffey-Atkinson B, E. SA, Wapnir RA. (1998). The role of dietary zinc in modifying the onset and severity of spontaneous diabetes in the BB wistar rat. *Mol Genet Metab.* 63, 205-13.
- tom Dieck H, Doring F, Roth HP, Daniel H. (2003). Changes in rat hepatic gene expression in response to zinc deficiency as assessed by DNA arrays. *J Nutr.* 133, 1004-10.
- Touillon C, Bansillon V, Vallon JJ, Badinand A, Comtet JJ. (1975). [Study of the zinc levels in serum and erythrocytes in burn patients (author's transl)]. *Clin Chim Acta.* 63, 115-20.
- Trinder P. (1969). Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. *J Clin Pathol.* 22, 246.
- Tsuda M, Imaizumi K, Katayama T, Kitagawa K, Wanaka A, Tohyama M, Takagi T. (1997). Expression of zinc transporter gene, ZnT-1, is induced after transient forebrain ischemia in the gerbil. *J Neurosci.* 17, 6678-84.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39, 44-84.
- Vallee BL, Auld DS. (1990). Zinc coordination, function and structure of zinc enzymes and others proteins. *Biochemistry.* 29, 5647-59.

- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, RESEARCH0034.
- Verstraeten SV, Scherier S, Nogueira L, Oteiza PI. (1997). Effect of trivalent metal ions on phase separation and membrane lipid packing. Role in lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 338, 121-7.
- Voruganti VS, Klein GL, Lu HX, Thomas S, Freeland-Graves JH, Herndon DN. (2005). Impaired zinc and copper status in children with burn injuries: need to reassess nutritional requirements. *Burns.* 31, 711-6.
- Walker HL, Mason AD, Jr. (1968). A standard animal burn. *J Trauma.* 8, 1049-51.
- Walsh CT, Sandstead HH, Prasad AS, Newberne PM, Fraker PJ. (1994). Zinc: health effects and research priorities for the 1990s. *Environ Health Perspect.* 102 Suppl 2, 5-46.
- Walters M, Roe FJ. (1965). A study of the effects of zinc and tin administered orally to mice over a prolonged period. *Food Cosmet Toxicol.* 3, 271-6.
- Wang B, Feng WY, Wang TC, Jia G, Wang M, Shi JW, Zhang F, Zhao YL, Chai ZF. (2006). Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice. *Toxicol Lett.* 161, 115-23.
- Wang F, Kim BE, Petris MJ, Eide DJ. (2004a). The mammalian Zip5 protein is a zinc transporter that localizes to the basolateral surface of polarized cells. *J Biol Chem.* 279, 51433-41.
- Wang K, Zhou B, Kuo YM, Zemansky J, Gitschier J. (2002). A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am J Hum Genet.* 71, 66-73.
- Wang WH, Li LF, Zhang BX, Lu XY. (2004b). Metallothionein-null mice exhibit reduced tolerance to ultraviolet B injury in vivo. *Clin Exp Dermatol.* 29, 57-61.
- Wang X, Ou D, Yin J, Wu G, Wang J. (2009). Proteomic analysis reveals altered expression of proteins related to glutathione metabolism and apoptosis in the small intestine of zinc oxide-supplemented piglets. *Amino Acids.* 37, 209-18.
- Wassermann D. (2002). Critères de gravité des brûlures. Épidémiologie, prévention, organisation de la prise en charge. Severity of burn injuries, epidemiology, prevention, french burn care organization. *Pathologie Biologie.* 50, 65-73.
- Weiss SJ. (1986). Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand.* 548, 9-37.
- WFSC. (2007). Population Comparisons for Fire Deaths (2002-2004). World Fire Statistics Centre - The Geneva Association Web site.
- WHO. (2002a). WHO Global Burden of Disease Database. Genève.
- WHO. (2002b). The World Health Report 2002. Geneva, Switzerland. World Health Organization.
- Williams RN, Rajput-Williams J, West J, Nigdikar S, Foote J, Howard A. (1995). Plasma, granulocyte and mononuclear cell copper and zinc in patients with diabetes mellitus. *Analyt.* 120, 887-90.
- Willis MS, Monaghan SA, Miller ML, McKenna RW, Perkins WD, Levinson BS, Bhushan V, Kroft SH. (2005). Zinc-induced copper deficiency: a report of three cases initially recognized on bone marrow examination. *Am J Clin Pathol.* 123, 125-31.

- Wilson RL. (1988). Zinc and iron in free radicals pathology and cellular control *Zinc in human biology*; pp. 147-72. Berlin: Springer-Verlag.
- Witkiewicz-Kucharczyk A, Bal W. (2006). Damage of zinc fingers in DNA repair proteins, a novel molecular mechanism in carcinogenesis. *Toxicol Lett.* 162, 29-42.
- Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. (1983). Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Res Vet Sci.* 34, 253-6.
- Yadrick MK, Kenney MA, Winterfeldt EA. (1989). Iron, copper, and zinc status: response to supplementation with zinc or zinc and iron in adult females. *Am J Clin Nutr.* 49, 145-50.
- Yan M, Song Y, Wong CP, Hardin K, Ho E. (2008). Zinc deficiency alters DNA damage response genes in normal human prostate epithelial cells. *J Nutr.* 138, 667-73.
- Yang H, Sheng Z, Guo Z, Shi Z, Lu J, Chai J, Sun C. (1997). Oxygen free radical injury and its relation to bacterial and endotoxin translocation after delayed fluid resuscitation: clinical and experimental study. *Chin Med J (Engl).* 110, 118-24.
- Yousef MI, El-Hendy HA, El-Demerdash FM, Elagamy EI. (2002). Dietary zinc deficiency induced-changes in the activity of enzymes and the levels of free radicals, lipids and protein electrophoretic behavior in growing rats. *Toxicology.* 175, 223-34.
- Yu D, Qin F, Sun Y. (1999). [Effects of metallothionein (MT) on burned skin of rats]. *Zhonghua Zheng Xing Shao Shang Wai Ke Za Zhi.* 15, 92-4.
- Zago MP, Mackenzie GG, Adamo AM, Keen CL, Oteiza PI. (2005). Differential modulation of MAP kinases by zinc deficiency in IMR-32 cells: role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Antioxid Redox Signal.* 7, 1773-82.
- Zago MP, Oteiza PI. (2001). The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radic Biol Med.* 31, 266-74.
- Zalewski PD, Millard SH, Forbes IJ, Kapaniris O, Slavotinek A, Betts WH, Ward AD, Lincoln SF, Mahadevan I. (1994). Video image analysis of labile zinc in viable pancreatic islet cells using a specific fluorescent probe for zinc. *J Histochem Cytochem.* 42, 877-84.
- Zhang B, Xu L, Fu W. (2002). [Study on the mechanism of hepatocytic insulin signal transduction defects in severely scalded rats]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 18, 220-2.
- Zhang C, Sheng ZY, Hu S, Gao JC, Li JY, Liu Y. (2004). The role of oxygen-free radical in the apoptosis of enterocytes in scalded rats after delayed resuscitation. *J Trauma.* 56, 611-7.
- Zhou Z, Wang L, Song Z, Saari JT, McClain CJ, Kang YJ. (2005). Zinc supplementation prevents alcoholic liver injury in mice through attenuation of oxidative stress. *Am J Pathol.* 166, 1681-90.
- Zhou ZB, Ding HQ, Qin FJ, Liu L, Cheng S. (2003). Effect of Zn<sup>2+</sup>-metallothionein on oxidative stress in liver of rats with severe thermal injury. *Acta Pharmacol Sin.* 24, 764-70.













---

## Résumé

Les brûlures sévères de plus de 20 % de la surface corporelle sont associées à un stress oxydant, à une réponse inflammatoire et à un hypermétabolisme intenses. La déficience en éléments-trace essentiels comme le zinc et le sélénium est également bien établie. Or, l'importance de ces éléments a été redécouverte avec la démonstration de leurs fonctions clés au niveau des systèmes antioxydants, de l'immunité, de l'inflammation, de la cicatrisation, de l'érythroïèse... Dans ce contexte, le rôle de la supplémentation nutritionnelle, chez les patients brûlés, est primordial car elle participe à la qualité des soins et améliore leurs rétablissements. Toutefois, ce domaine reste encore trop peu exploré et un consensus dans les apports doit être trouvé.

L'objectif de notre travail a été d'étudier, sur un modèle expérimental de rats brûlés subdéficients en zinc, l'impact d'une brûlure sévère sur l'évolution du statut en zinc, le statut antioxydant, le système glucose/insuline et l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie et le transport du Zn (ZnT, Zip, métallothionéine) ainsi que les conséquences d'un apport thérapeutique en zinc sur ces mêmes paramètres.

La subdéficience en zinc entraîne, après brûlure, une modification des flux inter-organes de zinc ainsi qu'une accentuation de l'insulino-résistance sans toutefois altérer massivement le statut antioxydant. Si, les apports en zinc permettent de restaurer le statut en Zn et d'accroître l'expression de la métallothionéine, ils ne réussissent pas à augmenter l'activité des enzymes antioxydantes et affectent les transporteurs du zinc de manière aléatoire et inattendue. Par conséquent, conserver un statut en zinc optimal, après brûlure, est primordial. Cependant, la mise en œuvre de la supplémentation en zinc reste complexe et des travaux complémentaires sont nécessaires pour la maîtriser.

---

## Title

Zinc and burn injury: Study of zinc status and supplementation effect on an animal model of severe burn injury. Metabolic and molecular investigations.

---

## Abstract

Severe burn injuries, involving more than 20 % of the body surface, are characterized by a strong oxidative stress, an intense inflammatory response and months-long hypermetabolism. Trace element deficiencies have been well-established. Key role of these elements has been re-emphasised with their utility in free radical scavenging, immunity, inflammation, wound healing, erythropoiesis... Consequently, trace element supplementation in burned patients is essential since it participates to quality of cares and enhances their recovery. Nevertheless, studies on trace elements alterations and supplementations remain too scarce whereas a consensus has to be elaborated.

The aim of our study was to investigate, using an animal model of zinc subdeficient burned rats, the potential impact of severe burn on oxidative status, evolution of zinc status, glucose/insulin system and expression of genes involved in zinc transport and homeostasis (ZnT, Zip, metallothionein) as well as therapeutic zinc supplementation consequences on these above-mentioned parameters.

Zinc deficiency leads, after burn, to an alteration of zinc transfer between tissues and to an insulin-resistance enhancement without, however, affecting strongly antioxidant status. Whether zinc supplementation restores zinc status and enhances expression of metallothionein, it fails to improve the activity of antioxidant enzymes and affects zinc transporters in an unexpected and random manner. Consequently, to keep optimal zinc status, after burn injury, is essential. Nevertheless, supplementation remains complex and can not be considered as an innocuous action.

---

**Mots clés :** Brûlure, statut en zinc, stress oxydant, métallothionéine, transporteurs du zinc, modèle animal.

---

## Intitulé et adresse du laboratoire

Centre de Recherches du Service de Santé des Armées  
Département de Radiobiologie et Radiopathologie  
24 Avenue des Maquis du Grésivaudan – BP 87  
38702 LA TRONCHE Cedex