

Université de Montréal

**NUTRITION PARENTÉRALE DU NOUVEAU-NÉ :  
MODULATION DU STRESS OXYDANT ET  
CONSÉQUENCES HÉPATIQUES**

par

Khalil MILOUDI

Département de sciences biomédicales

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor  
en sciences biomédicales  
option générale

Octobre, 2011

© Khalil MILOUDI, 2011



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

NUTRITION PARENTÉRALE DU NOUVEAU-NÉ : MODULATION DU STRESS  
OXYDANT ET CONSÉQUENCES HÉPATIQUES

Présentée par :  
Khalil MILOUDI

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Christian LACHANCE, président-rapporteur  
Dr Jean-Claude LAVOIE, directeur de recherche  
Dr Blandine COMTE, co-directeur  
Dr Fernando ALVAREZ, membre du jury  
Dr Diane AVERILL, examinateur externe  
Dr Eric THORIN, représentant du doyen de la FES

## *Résumé*

**Introduction** : Les enfants prématurés ont la particularité de naître alors que leur développement est souvent incomplet et nécessite la mise en œuvre de soins intensifs visant à poursuivre leur croissance en dehors de l'environnement utérin. Souvent cependant, le stade développemental de l'enfant ne lui permet pas d'assimiler une alimentation entérale du fait de l'immaturation de son système digestif. Le recours à une voie centrale délivrant les nutriments assurant le développement devient alors une nécessité. Ce type de nutrition, appelée nutrition parentérale (NP, ou *total parenteral nutrition* TPN), permet l'administration de molécules simples, directement dans le sang du prématuré. Il n'est toutefois pas exempt de risques puisque, exposée à la lumière, la NP peut s'oxyder et générer des molécules oxydantes telles que des hydroperoxydes lipidiques susceptibles de se fragmenter par la suite en hydroxy-alkénals. Ceci devient problématique au vu de l'immaturation des systèmes de défenses antioxydants du nouveau-né prématuré. L'utilisation prolongée de la NP est d'ailleurs à l'origine de maladies hépatiques dans lesquelles le stress oxydant et la nécro-inflammation sont des composantes majeures. Nous avons émis l'hypothèse que *l'infusion chez les enfants prématurés, d'aldéhydes d'origine lipidique est en relation avec le développement du stress oxydant et de l'inflammation hépatique.*

**Objectif** : Notre étude a consisté à évaluer la relation entre les quantités d'hydroxy-alkénals dans la NP et les effets hépatiques engendrés sur les marqueurs de stress oxydant et les voies de signalisation responsables d'une induction de processus inflammatoire. Dans ce but, nous avons cherché à mesurer la peroxydation lipidique dans l'émulsion lipidique de la NP et la conséquence de l'infusion en continue d'hydroxy-alkénals sur les marqueurs de stress oxydant, sur la voie de signalisation médiée par le *Nuclear Factor*  $\kappa$ B et sur le déclenchement du processus inflammatoire hépatique. A la suite de ce travail, nous avons également travaillé sur des alternatives à la photoprotection, qui est la seule méthode réellement optimale pour réduire la peroxydation des lipides de la NP, mais cliniquement difficilement praticable. **Résultats** : Nos résultats ont mis en évidence la génération de 4-hydroxynonanal *in vitro* dans la NP, ce phénomène est augmenté par une exposition

lumineuse. Dans ce cadre, nous avons montré l'inefficacité de l'ajout de multivitamines dans l'émulsion lipidique comme alternative à la photoprotection. Dans la validation biologique qui a suivi sur un modèle animal, nos résultats ont permis de démontrer que l'augmentation des adduits glutathion-hydroxynonanal était imputable à l'augmentation de 4-hydroxynonanal (4-HNE) dans la NP, et non à une peroxydation endogène. Nos données indiquent que la probable augmentation hépatique des niveaux de 4-HNE a conduit à une activation du NFκB responsable de l'activation de la transcription des gènes pro-inflammatoires du *Tumour Necrosis Factor-α* (TNF-α) et de l'interleukine-1 (IL-1). Nous avons alors évalué la capacité d'une émulsion lipidique enrichie en acides gras polyinsaturés (AGPI) n-3 à baisser les concentrations de 4-HNE dans la NP, mais également à moduler le stress oxydant et les marqueurs pro-inflammatoires. Enfin, nous avons démontré, en collaboration avec l'équipe du Dr Friel, que certains peptides isolés du lait humain (par un processus mimant la digestion) permettent également une modulation du stress oxydant et du processus inflammatoire. **Conclusion** : Le stress oxydant exogène issu de la NP a conduit par activation de facteurs de transcription intra-hépatiques au déclenchement d'un processus inflammatoire potentiellement responsable du développement de maladies hépatiques reliées à la NP telle que la cholestase. Dans ce sens, les AGPI n-3 et les peptides antioxydants peuvent se poser en tant qu'alternatives crédibles à la photoprotection.

**Mots-clés** : Prématurité, nutrition parentérale, peroxydation lipidique, stress oxydant, inflammation, 4-hydroxynonanal

## *Abstract*

**Introduction:** Premature infants usually born before full term require intensive care to continue to grow up outside the uterine environment. Premature newborns are born with gastrointestinal systems that are too immature to absorb nutrients safely. Therefore they receive their initial nutrients through intravenous feeding, called total parenteral nutrition which delivers simple nutrients directly into bloodstream. However, light exposed-TPN can generate oxidant molecules such as lipid hydroperoxides, which can potentially break up into hydroxy-alkenals. Prolonged use of TPN is also a cause of liver disease in which oxidative stress and necro-inflammation are major components. Thus, we hypothesize that *lipid aldehydes contained in TPN are associated with oxidative stress and hepatic inflammation developments.* **Objectives:** The aim of our study is to assess the relationship between quantities of hydroxyl-alkenals generated in TPN and effects on oxidative stress biomarkers and cell-signalling pathway molecules implicated in hepatic inflammation induction. To this end, we measure lipid peroxidation in the TPN lipid emulsion in and the consequence of continuous infusion of hydroxy-alkenals on markers of oxidative stress, on cell-signaling pathway mediated by the NFkB, and on liver inflammation induction. Following these data, we also worked on alternatives of photoprotection, which is the only optimal method for preventing lipid peroxidation, but unfortunately clinically impractical.

**Results:** *In vitro* studies have highlighted the generation of 4-HNE in the TPN, increased under light exposure. In this context, we have demonstrated that the addition of multivitamins in the lipid emulsion cannot be a valuable alternative to photoprotection. Concerning the biological validation in our guinea pig animal model, our results demonstrated that the increase of GS-HNE adducts was due to increased 4-HNE in the TPN, and does not provide from endogenous peroxidation. Our data also indicate that the increase of hepatic 4-HNE led to an activation of NFkB, responsible for the activation of the transcription of proinflammatory genes TNF- $\alpha$ , IL-1. In the next study, we have evaluated the ability of a lipid emulsion enriched with n-3 polyunsaturated

fatty acids (PUFA) to reduce 4-HNE concentrations generated in TPN, and to modulate oxidative stress markers and pro-inflammatory process on the same animal model. We also have demonstrated, in collaboration with Dr Friel's team, that two antioxidant peptides (derived from a process mimicking digestion process of human milk) allow also a modulation of oxidative stress and inflammatory process in the liver.

**Conclusion:** This form of exogenous oxidative stress from the TPN led to an inflammatory process resulting from the activation of intrahepatic transcription, which is potentially responsible of liver disease development such as cholestasis. In this sense, the n-3 PUFA and antioxidant peptides may arise as a valuable alternative of photoprotection.

**Keywords:** Prematurity, parenteral nutrition, lipid peroxidation, oxidative stress, inflammation, 4-hydroxynonenal

## *Table des matières*

<i>INTRODUCTION</i> .....	<i>1</i>
<b>1 La grande prématurité</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1 Épidémiologie</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2 Facteurs de risques et causes de la prématurité</b> .....	<b>7</b>
<b>1.3 Conséquences</b> .....	<b>8</b>
1.3.1 Immaturité du système digestif .....	9
1.3.2 Immaturité du système de défense antioxydante .....	10
<b>2 La nutrition parentérale</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1 Définition</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2 Composition</b> .....	<b>11</b>
2.2.1 Apport hydrique .....	12
2.2.2 Apport glucidique.....	12
2.2.3 Apport en acides aminés.....	12
2.2.4 Apport lipidique .....	13
2.2.5 Apport en vitamines .....	14
2.2.6 Apport en oligoéléments et minéraux.....	16
<b>2.3 Transition vers une nutrition entérale</b> .....	<b>18</b>
<b>2.4 Administration de la NP</b> .....	<b>20</b>
<b>2.5 Exposition lumineuse de la NP</b> .....	<b>21</b>
2.5.1 La riboflavine comme photosensibilisant.....	21
2.5.2 La peroxydation lipidique .....	24
2.5.3 Alternatives .....	24
<b>2.6 Les complications associées à la NP</b> .....	<b>25</b>
<b>3 Métabolites d'oxydation et stress oxydant</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1 Les radicaux libres et les produits secondaires d'oxydation</b> .....	<b>27</b>
3.1.1 Qu'est-ce qu'une espèce radicalaire? .....	27



3.1.2	Formation des ERO .....	27
3.1.3	Formation des espèces radicalaires de l'azote (ERA) .....	29
3.1.4	La peroxydation lipidique .....	31
3.1.4.1	Mécanisme de la peroxydation lipidique .....	31
3.1.4.2	Produits d'oxydation primaire .....	32
3.1.4.3	Produits d'oxydation secondaire .....	33
<b>3.2</b>	<b>Les systèmes antioxydants. ....</b>	<b>37</b>
3.2.1	Les antioxydants non enzymatiques .....	38
3.2.1.1	Le glutathion .....	38
3.2.1.2	Les thioredoxines .....	39
3.2.1.3	L'acide ascorbique .....	40
3.2.1.4	Les tocophérols .....	41
3.2.2	Les enzymes antioxydantes .....	42
3.2.2.1	Les superoxydes dismutases .....	42
3.2.2.2	La catalase .....	44
3.2.2.3	Les glutathion peroxydases et réductases .....	45
3.2.2.4	Les glutathion-S-transférases .....	47
3.2.2.5	Les aldécétose réductases et aldéhyde deshydrogénases .....	48
<b>3.3</b>	<b>Stress oxydant et nitrosant.....</b>	<b>48</b>
3.3.1	Potentiel redox cellulaire .....	49
3.3.2	Métabolites d'oxydation de la nutrition parentérale .....	49
3.3.2.1	Le peroxyde d'hydrogène .....	49
3.3.2.1.1	Généralités .....	49
3.3.2.1.2	Formation .....	49
3.3.2.1.3	Structure et réactivité .....	50
3.3.2.1.4	Cibles biochimiques du peroxyde d'hydrogène .....	50
3.3.2.1.5	Impact du peroxyde d'hydrogène sur la signalisation cellulaire .....	51
3.3.2.2	Le <i>trans</i> -4-hydroxy-2-nonal .....	52
3.3.2.2.1	Généralités .....	52
3.3.2.2.2	Formation .....	52
3.3.2.2.3	Structure et réactivité .....	53
3.3.2.2.4	Cibles biochimiques du 4-HNE .....	54
3.3.2.2.5	Réactions avec les peptides et les protéines .....	56
3.3.2.2.6	Réactions avec les lipides .....	56

3.3.2.2.7	Réactions avec les cofacteurs.....	57
3.3.2.2.8	Réactions avec les acides nucléiques.....	57
3.3.2.2.9	Élimination du 4-HNE, intermédiaires et réactions enzymatiques.....	57
3.3.2.2.10	Vitesse d'élimination.....	58
3.3.2.2.11	Intermédiaires primaires.....	58
3.3.2.2.12	Intermédiaires secondaires.....	60
3.3.2.2.13	Métabolisme du 4-HNE.....	61
3.3.2.2.14	Impact du 4-HNE sur la signalisation cellulaire.....	62
3.3.2.2.15	4-HNE et physiopathologie hépatique humaine.....	65
3.3.2.2.16	Impacts du 4-HNE sur l'expression génique.....	65
3.3.2.3	Le <i>trans</i> -4-hydroxy-2-hexenal.....	66
3.3.2.3.1	Chimie réactionnelle.....	66
3.3.2.3.2	Cibles biochimiques du 4-HHE.....	67
3.3.2.3.3	Métabolisme du 4-HHE, intermédiaires et réactions enzymatiques.....	67
3.3.2.3.4	Impacts du 4-HHE sur la signalisation cellulaire.....	68
3.3.2.3.5	Impacts du 4-HHE sur l'expression génique.....	68
<b>4</b>	<b>Stress oxydant et pathologies du prématuré.....</b>	<b>69</b>
<b>4.1</b>	<b>Cas des maladies hépatiques.....</b>	<b>70</b>
<b>4.2</b>	<b>La cholestase.....</b>	<b>71</b>
4.2.1	Définition.....	71
4.2.2	Composante inflammatoire : point de départ d'une pathogenèse hépatique... ..	72
4.2.3	... associée au stress oxydant ?.....	73
<b>5</b>	<b>Hypothèses et objectifs.....</b>	<b>74</b>
<i>ARTICLES.....</i>		<b>78</b>
<i>DISCUSSION GÉNÉRALE.....</i>		<b>169</b>
<b>1.</b>	<b>STRESS OXYDANT SOUS NUTRITION PARENTÉRALE.....</b>	<b>171</b>
<b>2.</b>	<b>MODULATION DU STRESS OXYDANT PAR LES AGPI N-3.....</b>	<b>176</b>
<b>3.</b>	<b>STRESS OXYDANT ET SUPPLÉMENTATION DE LA NP EN PEPTIDES.....</b>	<b>182</b>
<i>CONCLUSION.....</i>		<b>187</b>

*PERSPECTIVES*..... 189

*BIBLIOGRAPHIE*..... 192

## *Liste des tableaux*

---

*Tableau 1 : Facteurs responsables de l'accouchement prématuré*

*Tableau 2 : Composition de 5 émulsions lipidiques disponibles dans le commerce*

Liste des figures

---

**Figure 1 : Mécanisme d'excitation de la riboflavine en solution**

**Figure 2 : Réactions de photo-oxydation de type I et II**

**Figure 3 : Génération du peroxyde d'hydrogène et du radical hydroxyle en solution**

**Figure 4 : Phase d'initiation de l'oxydation des AGPI, de propagation et de terminaison radicalaire entraînant la formation d'un radical peroxy, puis d'un hydroperoxyde qui après fragmentation, produira des aldéhydes et des alcanes.**

**Figure 5 : Mécanisme de formation des séries 5, 12, 8 et 15 des F<sub>2</sub>-isoprostanes**

**Figure 6 : Formation des différents isomères d'isoprostanes formés selon la substitution du noyau prostane**

**Figure 7 : Formation de la série F<sub>3</sub>-isoprostane, à partir de l'acide eicosapentaénoïque**

**Figure 8 : Régénération de la thioredoxine**

**Figure 9 : Oxydation de l'acide ascorbique en acide dehydroascorbique**

**Figure 10 : Système de recyclage des molécules antioxydantes**

**Figure 11 : Fonctionnement enzymatique bi bi ping pong des GPx**

**Figure 12 : Mode d'action des GPx**

**Figure 13 : Formation du 4-HNE à partir de l'acide 11- hydroperoxyarachidonique**

**Figure 14 : Réactivité du 4-HNE avec formation d'un adduit de Michael**

**Figure 15: Réactivité du 4-HNE avec formation d'une base de Schiff**

**Figure 16: Principales voies métaboliques du-HNE**

*Figure 17 : Métabolites secondaires du 4-HNE*

*Figure 18 : Métabolisation du 4-hydroxynonanoate*

## *Abréviations*

---

aa	acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Acide gras
AGMI	Acide gras monoinsaturé
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AGS	Acide gras saturé
ALDH	Aldéhyde deshydrogénase
AR	Aldocétose réductase
<i>Bsep</i>	<i>Bile salt export pump</i>
CLHP-MS de masse	Chromatographie à haute pression couplée à un spectromètre
Cu/Zn SOD	Superoxyde dismutase à cuivre/Zinc
DHA	Acide docosahexaénoïque
DHAsc	Déhydroascorbate
DHN	Dihydroxynonène
DBP	Dysplasie bronchopulmonaire
EC SOD	Superoxyde dismutase extracellulaire
Enz	Enzyme
ERA	Espèce réactive de l'azote
ERO	Espèce réactive de l'oxygène
FAD	Flavine Adénine dinucléotide
FMN	Flavine mononucléotide
FiO <sub>2</sub>	Fraction inspirée d'oxygène
GC	Gas chromatography
GPx	Glutathion peroxydase

GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion S-transférase
HNA	Acide hydroxynonénoïque
IL-1	Interleukine 1
IL-8	Interleukine 8
IsoP	Isoprostanes
JNK	c-jun N-terminal kinase
LC	<i>Liquid chromatography</i>
MA	Acide mercapturique
MAPEG	Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione
MAPk	Mitogen Activated protein Kinase
MDA	Malondialdéhyde
MEF	<i>Minimal Enteral Feeding</i>
Mn SOD	Superoxyde dismutase à Manganèse
MPT	<i>mitochondrial permeability transition</i>
<i>Mrp</i>	<i>Multidrug resistance protein</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i>
MV	Multivitamines pédiatriques
MV-AA	Multivitamines dans les acides aminés
MV-LIP	Multivitamines dans les lipides
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucléotide
NADPH	Nicotinamide Adenine dinucléotide Phosphate
NFκB	Nuclear Factor <i>kappa</i> B
NOS	<i>Nitric Oxyde synthase</i>
NOx	NADPH Oxydase
<i>Ntcp</i>	<i>Sodim-taurocholate transporting polypeptide</i>
Np	Neuroprostanes
<i>Oatp</i>	<i>Organic anion transporter polypeptide</i>



OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PG	Prostaglandines
Rf	Riboflavine
Rtk	Récepteur tyrosine kinase
TG	Triglycérides
TNF- $\alpha$	Tumour Necrosis Factor <i>alpha</i>
TPN	Total parenteral nutrition
4-HNE	<i>trans</i> -4-hydroxy-2-nonenal
4-HHE	<i>trans</i> -4-hydroxy-2-hexenal
4-HNE-SG	Adduit <i>trans</i> -4-hydroxy-2-nonenal-glutathion
4-HHE-SG	Adduit <i>trans</i> -4-hydroxy-2-hexenal-glutathion

*« Fiez-vous aux rêves car en eux est cachée la  
porte de l'éternité » Khalil Gibran, **Le Prophète***

## *Remerciements*

Vous m'avez élevé, fait grandir, appris des leçons dont la profondeur est encore aujourd'hui inégalée. Vous m'avez appris un jour qu'on ne donne que peu lorsque l'on donne ses biens, que c'est en donnant de nous-mêmes que l'on donne réellement. Vous avez dit vrai. J'essaie de vous ressembler chaque jour un peu plus, et je ne vous remercierai jamais assez pour l'exemple que vous avez su être.

Je ne peux qu'exprimer ma profonde gratitude envers les personnes qui m'ont fait progresser à pas de géant. Leur qualité se résume en un profond enthousiasme pour la science et un désir de la partager qui relève de la rareté. Je tiens à remercier le Dr Lavoie pour sa disponibilité. Sa porte a toujours été ouverte, que ce soit pour des questions professionnelles ou des conseils plus personnels. Je ne remercierai jamais assez le Dre Comte pour la rigueur et le désir de toujours approfondir qu'elle a pu m'inculquer. Je n'oublie pas que si j'ai pu venir faire un doctorat et découvrir de nouveaux horizons de travail, c'est à elle que je le dois.

Je ne peux faire autrement que de remercier Thérèse Rouleau, qui au sein du laboratoire s'est révélée être l'âme de l'équipe. Un grand merci pour tout le soutien et le support qu'elle a pu m'apporter. Je tiens également à remercier mes collègues de laboratoire, et tout particulièrement Raffi et Wesam pour la bonne humeur qu'ils ont su distiller.

Il serait absolument ingrat de ne pas remercier les personnes qui ont pu m'aider pendant cette période. De l'animalerie, en passant par l'étage A et tous les autres, du fond du cœur merci pour tout ce que vous avez pu m'apporter comme soutien. Vous êtes trop souvent oubliés, mais je tiens à ce que vous soit rendu hommage.

Les amis se sont succédé durant ces années. Certains sont partis, d'autres sont restés, mais tous ont compté pour moi. J'ai une pensée particulière pour Thierry et Dominika qui ont toujours su être là dans les moments délicats.

Enfin, ma dernière pensée est pour toi. Après toutes ces années nous continuons de nous découvrir au quotidien. Je continue de découvrir tes trésors de gentillesse et de patience, sans lesquels le doctorat aurait été infiniment plus difficile. Merci de m'avoir adouci le quotidien. « *Ne pensez pas que vous pouvez infléchir le cours de l'amour, car l'amour s'il vous trouve digne dirige votre cours* ». A tes côtés, je me suis laissé embarquer sur le cours d'un fleuve de vie sinueux dont le delta m'a révélé l'extraordinaire bonheur de devenir père. Les mots ne sont rien pour te dire à quel point je suis heureux de t'avoir, de vous avoir à mes côtés.

# INTRODUCTION

Les problèmes associés à la prématurité se posent depuis plus d'un demi-siècle maintenant. L'avancée des travaux sur le sujet a permis la réalisation d'extraordinaires prouesses médicales, visant à reculer toujours plus loin les limites de l'impossible. Cette détermination a octroyé à des enfants nés prématurés la possibilité de survivre et grandir, en repoussant les records de prématurité jusqu'à descendre aujourd'hui dans des cas extrêmes à une gestation de juste 22 semaines d'aménorrhée [1].

L'avenir des enfants de moins de 28 semaines et les conséquences futures majeures associées à cette « course à la vie » peuvent toutefois interpeller. Leur développement incomplet nécessite la mise en œuvre de soins intensifs visant à poursuivre leur croissance en dehors de l'environnement utérin [2]. L'une des missions essentielles est donc de leur fournir très rapidement une alimentation adéquate. Souvent cependant, le stade développemental de l'enfant ne lui permet pas d'assimiler une alimentation entérale du fait de l'immaturité de son système digestif [3]. Le recours à une voie centrale délivrant les nutriments assurant le développement devient alors une nécessité. Ce type de nutrition, appelée nutrition parentérale totale (pour *total parenteral nutrition*, TPN), permet l'administration de molécules simples, directement dans le sang du prématuré [4].

La qualité des solutions infusées doit donc être la meilleure et la plus adaptée possible. Les risques de septicémie sont réels et le système de défense immunitaire n'étant pas encore fonctionnel [5], cela peut conduire à la pathogenèse de maladies pulmonaires [6-8] ou hépatiques [9-11]. Il faut cependant avoir conscience qu'un danger réside également dans l'utilisation de la nutrition parentérale elle-même. Chimiquement parlant, elle s'apparente à un mélange réactif, dont les molécules constituantes sont capables d'interagir entre elles pour former des espèces chimiques oxydantes instables. Ceci se vérifie dans les TPN ayant des constituants ajustés de façon spécifique, déstabilisant l'équilibre précaire créé initialement.

Le système de protection antioxydant de l'enfant n'étant mature qu'au cours du troisième trimestre de grossesse [12-15], la production d'espèces oxydantes infusées en

continue devient problématique chez les prématurés de moins de 28 semaines de gestation. Parmi ces espèces, le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) issu de l'oxydation des multivitamines (MV), le *trans*-4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) issu de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) de la série n-6 [16, 17] et le *trans*-4-hydroxy-2-hexenal (4-HHE) issu de la peroxydation de ceux de la série n-3, sont les molécules qui nous ont particulièrement intéressés au cours de ce projet de doctorat et ce pour plusieurs raisons. Ce sont des espèces produites à des concentrations biologiquement actives et qui peuvent aussi agir comme « seconds messagers » et jouer des rôles essentiels dans l'activation de phénomènes tels que l'inflammation hépatique qui peuvent conduire ultérieurement au développement de pathologies.

Nos travaux ont visé à démontrer les effets biologiques de ces molécules oxydantes de la NP, et à mettre au point une stratégie permettant d'en réduire leur production. Notre étude s'est articulée autour de trois grandes parties :

En se basant sur les études qui avaient été entreprises au laboratoire sur la génération de peroxyde d'hydrogène dans la NP à partir des MV, nous avons axé nos recherches sur les métabolites issus de la peroxydation lipidique dans deux sources différentes de lipides, l'une riche en AGPI n-6 et l'autre enrichie en AGPI n-3. Nous avons développé une nouvelle méthode utilisant la chromatographie liquide à haute pression couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-MS), pour quantifier le 4-HNE et le 4-HHE générés dans la NP. A partir de ce qui a été publié dans la littérature, nous avons recherché une formulation susceptible de réduire la génération de ces produits issus de la peroxydation lipidique.

Nous avons ensuite cherché à mettre en évidence de potentiels effets biologiques de l'infusion de ces molécules en utilisant le modèle animal de NP utilisé au laboratoire. Nous avons également développé un outil pour mettre en évidence l'augmentation des niveaux de 4-HNE et 4-HHE sanguins et hépatiques. Ces molécules étant détoxifiées *in vivo* par le glutathion, qui les fixe par adduction, l'évaluation des concentrations de 4-hydroxy-

alkenals sera faite par la quantification des niveaux d'adduits *trans*-4-hydroxy-2-nonanal-glutathion (HNE-SG) et *trans*-4-hydroxy-2-hexenal-glutathion (4-HHE-SG) par CLHP-MS. Le suivi de l'augmentation du niveau hépatique ces adduits nous a permis de corréler l'implication du 4-HNE avec l'oxydation du potentiel redox hépatique et le déclenchement d'un phénomène inflammatoire au niveau du foie.

Dans la troisième partie de mon projet de thèse, nous avons cherché des alternatives simples qui pourraient réduire l'oxydation des lipides de la nutrition parentérale et donc limiter l'inflammation hépatique. Nous avons pour cela utilisé une approche biotechnologique axée sur la valorisation de matériel biologique. Le lait humain constitue un matériel de choix dans ce contexte. En partenariat avec le groupe de recherche du Dr Friel de l'université du Manitoba à Winnipeg, nous avons testé la capacité antioxydante de fractions protéiques du lait humain hydrolysé par un mélange d'enzymes mimant les conditions de digestion humaine (stomacale et intestinale). Deux peptides présentant une activité antioxydante ont été isolés et ont été ainsi utilisés en supplémentation dans la nutrition parentérale afin potentiellement, de réduire d'une part la génération de molécules oxydantes dans la NP et d'autre part, l'inflammation hépatique.

Cette thèse est divisée en trois parties :

✚ La première constituera un rappel bibliographique. Le premier chapitre sera consacré à la compréhension des enjeux et conséquences de la prématurité sur le nouveau-né, expliquant la nécessité de la NP. Le deuxième chapitre, axé sur la chimie fondamentale, développe les mécanismes moléculaires conduisant à la génération de métabolites d'oxydation dans la NP. Le dernier présente le stress oxydant, les systèmes mis en jeu ainsi que l'impact des métabolites d'oxydation.

✚ La deuxième partie présente les résultats des études entreprises sous forme de trois articles soumis, selon les trois parties évoquées précédemment; la génération de



molécules oxydantes dans la NP, les effets de la NP sur l'inflammation hépatique *in vivo*, et l'administration de peptides antioxydants issus de l'hydrolyse des protéines du lait humain dans le but de contrer le processus inflammatoire.

✚ La troisième partie conclut les travaux par une discussion générale de l'ensemble des résultats présentés et quelques perspectives terminent ce manuscrit.

# 1 La grande prématurité

La prématurité concerne les grossesses n'arrivant pas à leur terme. L'*Organisation Mondiale de la Santé* considère qu'une naissance se définit comme prématurée avant 37 semaines révolues d'aménorrhée. Lorsque l'on se situe sous les 32 semaines d'aménorrhée, on parle alors de grande prématurité [2].

## 1.1 Épidémiologie

La prématurité touche de plus en plus de pays dans le monde, même si les pays industrialisés sont encore pour le moment les plus concernés. Aux États-Unis, le pourcentage d'enfants prématurés atteint les 12-13%; il varie entre 5 et 9% en Europe [18, 19]. L'accouchement prématuré est devenu un problème clinique majeur en évolution depuis plusieurs années. Au Canada, la prématurité est passée de 6,1% en 1983 à 6,6% en 1991, 7,6% en 2000 et à 8,3% en 2007 (rapporté par le Ministère de la santé et des services sociaux, 2008). Les dernières données semblent toutefois mettre en évidence que le problème de la prématurité n'est plus l'apanage exclusif des pays industrialisés, puisqu'il s'étend également aux pays en voie de développement.

On classe les naissances prématurées selon 3 groupes :

- Les naissances spontanées avec membranes intactes, qui représentent environ 45% des accouchements prématurés;
- Les naissances provoquées (déclenchement ou césarienne);
- Les naissances prématurées dues à une rupture des membranes, avant le début des contractions.

Près de 75% des décès périnataux sont attribués à la prématurité des naissances et plus de 50% de la morbidité à long terme y est associée [20].

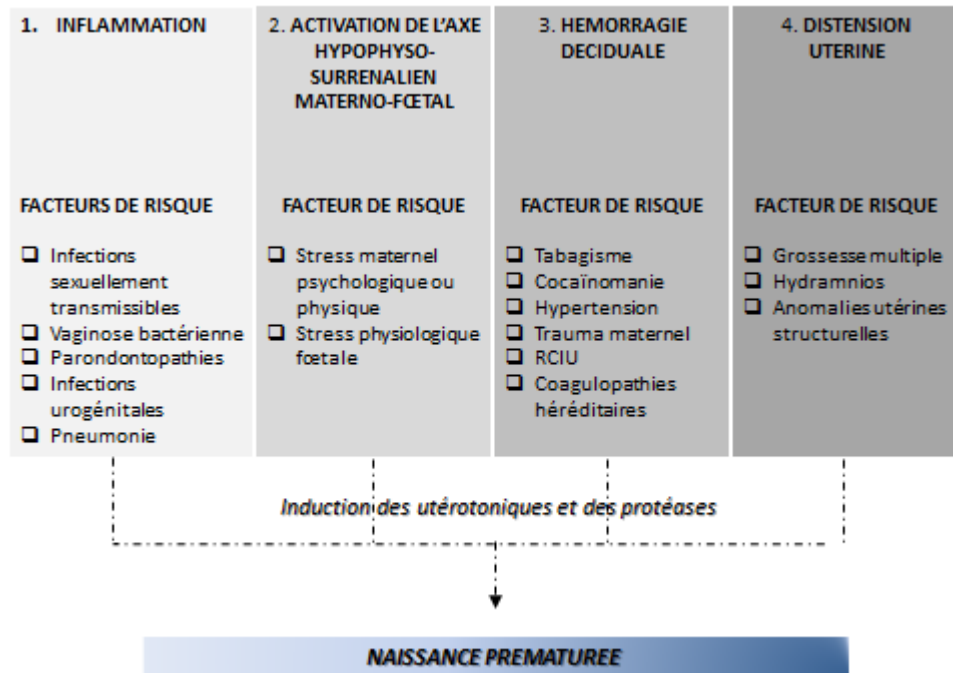
Une autre classification est également utilisée en considérant l'âge gestationnel de l'enfant [20] :

- L'extrême prématurité qui correspond à une période de gestation inférieure à 28 semaines; elle touche 5% des prématurés;
- La prématurité sévère (entre 28 et 31 semaines de gestation) qui regroupe 15% des prématurés;
- La prématurité modérée concerne les nouveau-nés ayant 32 à 33 semaines d'âge gestationnel et correspond à environ 20% des naissances prématurées;
- La prématurité proche du terme (entre 34 et 36 semaines de gestation) est la catégorie la plus fréquemment rencontrée puisqu'elle représente 60 à 70% des prématurés.

La grande prématurité englobe donc l'extrême prématurité et la prématurité sévère.

## **1.2 Facteurs de risques et causes de la prématurité**

Le déclenchement d'un accouchement prématuré est un processus qui peut être initié par de multiples facteurs. Dans leur revue de 2006, Romero *et al* ont décrit le syndrome d'accouchement prématuré et ont extrait 8 causes principales. Les infections maternelles, l'ischémie, la distension utérine, les maladies cervicales, la prééclampsie, les phénomènes d'allergie, les désordres d'origine endocrine et le rejet placentaire [21].



*Tableau 1 : Facteurs responsables de l'accouchement prématuré d'après Goldenberg et al [20]*

### 1.3 Conséquences

Même si la mortalité périnatale a décliné, les progrès se limitent cependant à une augmentation du taux de prématurés survivants (spectaculaire, puisque le taux de survie des nouveau-nés moins de 1500g est passé de 70% en 1970 à plus de 90% de nos jours). La prématurité est associée à court et long terme à des problèmes développementaux qui peuvent être importants. Du fait de l'immaturation de certaines fonctions physiologiques, elle peut être responsable de séquelles d'ordre cardio-respiratoire, neurologique, ou métabolique. Deux systèmes vont particulièrement retenir notre attention parce qu'ils sont liés à la mise en place de la NP et à la manière dont elle est formulée :

- Le système digestif. Son immaturité est responsable de la mise en place d'une NP.

- Le système de défenses antioxydantes. Le passage d'un environnement intra-utérin relativement pauvre en oxygène à un environnement extérieur riche en oxygène constitue une forte agression oxydante [22]. Chez le prématuré, les faibles niveaux d'enzymes de détoxification des molécules oxydantes ne permettent pas de les éliminer. Nos travaux ont permis de mettre en évidence que la NP est également susceptible de générer de nombreuses molécules pro-oxydantes.

### 1.3.1 Immaturité du système digestif

L'ontogenèse du système digestif démarre très tôt chez le fœtus [23]. Le tube endodermique est clos dès la 4<sup>ème</sup> semaine de gestation, les premières villosités font leur apparition à la 8<sup>ème</sup> semaine, et la formation complète des organes du système est achevée à la 12<sup>ème</sup> semaine [24, 25].

L'activation des processus de succion, de déglutition et de motilité gastrique est toutefois plus longue. On commence seulement à détecter la déglutition à partir de la 16<sup>ème</sup> semaine, mais le processus ne devient mature qu'autour de la 28<sup>ème</sup> semaine de vie intrautérine [26]. Même chose pour la motilité gastrique qui, bien qu'elle apparaisse à la 20<sup>ème</sup> semaine, n'est mature qu'à la 36<sup>ème</sup> semaine [27]. Ce n'est véritablement qu'à cette période que la succion et la déglutition se coordonnent avec la respiration, permettant ainsi à l'enfant de recevoir une nutrition entérale dès la naissance [28].

Au niveau enzymatique, la plupart des enzymes nécessaires à la digestion du lait sont rapidement synthétisées. Les  $\alpha$ -glucosidases [29], les dipeptidases [30, 31] et les lactases [32] sont fonctionnelles à partir de la 10<sup>ème</sup> semaine de vie. Cependant, certaines enzymes ont besoin d'une activation préalable par la trypsine, la chymotrypsine et les carboxypeptidases. Pour cela l'intestin grêle doit libérer une entérokinase, qui va se charger de transformer le trypsinogène en trypsine. L'activation de l'entérokinase n'a toutefois lieu qu'à la 26<sup>ème</sup> semaine [33, 34].

Selon la précocité de la prématurité, le système digestif mettra donc plus ou moins de temps avant de pouvoir devenir fonctionnel. Et en attendant qu'il soit complètement opérationnel, les besoins nutritionnels de l'enfant prématuré devront être couverts par la NP.

### **1.3.2 Immaturité du système de défense antioxydante**

Les enfants nés prématurés sont extrêmement sensibles aux molécules oxydantes quelles qu'elles soient [12]. Durant le développement du fœtus, l'expression des enzymes du système de défense antioxydante n'est pas identique dans tous les tissus. Si certaines enzymes gardent sensiblement la même activité durant toute la grossesse et après l'accouchement, d'autres sont nettement activées après la naissance à terme. Le stress oxydant associé au changement de pression partielle en oxygène lors de la naissance est un activateur de plusieurs enzymes.

Au niveau pulmonaire, il y a une forte augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes lors de la 32<sup>ème</sup> semaine de grossesse. La prématurité ne permet pas à ces systèmes d'arriver à maturation, et les travaux de Frank *et al* ont pu mettre en évidence l'immaturité des systèmes enzymatiques superoxyde dismutase (SOD), catalase et glutathion peroxydase (GPx) chez les prématurés de plusieurs espèces [14, 15, 35].

Au niveau hépatique, les systèmes anti-oxydants sont également nettement augmentés après la naissance. L'activité de la superoxyde dismutase à Cu/Zn (Cu/Zn-SOD) passe de 2,5 U/mg protéine (de 11 à 20 semaines) à 9,4 U/mg protéine après l'accouchement. La catalase hépatique suit le même processus puisque chez l'Homme, elle passe de 60 à 100  $\mu$ U/mg protéine après la naissance [13].

Les molécules antioxydantes telles que le glutathion sont exprimées de façon variable durant le développement. Lavoie et Chessex ont montré dans des cellules d'aspirats trachéaux d'enfants prématurés, que l'activité de synthèse et le système d'activation du glutathion de la 26<sup>ème</sup> à la 37<sup>ème</sup> semaine de gestation étaient matures; les

faibles niveaux de glutathion permettaient l'activation de la transcription génique des enzymes impliquées dans sa synthèse [36]. Dans les fluides issus de lavages bronchoalvéolaires, une concentration de glutathion plus faible que chez les enfants matures a d'ailleurs été associée au développement de maladies pulmonaires chroniques chez les enfants prématurés [37].

## **2 La nutrition parentérale**

Le but de la thèse n'étant pas une recherche exhaustive sur la nutrition parentérale, nous ne ferons que décrire succinctement sa composition. Cette science est en constante évolution et les grandes variations d'une unité de soin à une autre rendent difficile une généralisation des pratiques.

### **2.1 Définition**

La nutrition parentérale est le moyen de couvrir les besoins nutritionnels de l'enfant. Elle est utilisée chez les enfants ayant une résection intestinale, mais également chez les prématurés dont le système digestif est immature. Elle est ajustée de façon spécifique à l'enfant en fonction de son poids corporel. On l'utilise en moyenne durant les 3 premières semaines de vie [38].

### **2.2 Composition**

La NP est constituée des 5 grandes familles de constituants majoritaires, à savoir de glucides, d'un mélange d'acides aminés, d'oligoéléments, d'une préparation d'un ensemble de vitamines que l'on nommera au cours de la thèse « multivitamines » ou MV, et de lipides sous forme d'une émulsion lipidique [38]. Les apports décrits ci-dessous concernent les enfants prématurés autour de 28 semaines.

### **2.2.1 Apport hydrique**

L'apport hydrique doit être absolument administré à vitesse constante pour maintenir l'osmolalité aussi bien intra qu'extracellulaire, même après un arrêt temporaire de la perfusion. Il se chiffre en fonction du poids du jour de l'enfant. Le volume recommandé pour un prématuré pesant environ 1 500g est de 70 à 80 mL/kg/j. L'augmentation se fait graduellement par palier quotidien de 10 mL/kg/j jusqu'à une stabilisation à 150 à 160 mL/kg/j [39, 40].

### **2.2.2 Apport glucidique**

Plus que l'apport glucidique, il s'agit en réalité d'assurer au prématuré un apport en énergie non protéique sous forme de glucose. Il se résume à un apport de glucose qui débute à 7-8 g/kg/j en augmentant graduellement de 2 en 2 g/kg/j, jusqu'à stabilisation à 18-20 g/kg/j [39-41].

L'une des complications de la NP réside dans un mauvais contrôle de la glycémie avec des hypo- ou des hyperglycémies [42] qui lorsque répétées et persistantes peuvent conduire respectivement à une bradycardie ou à une polyurie osmotique et une hyponatrémie [43]. Dans le dernier cas, une perfusion d'insuline est souvent nécessaire afin de maintenir une glycémie optimale.

### **2.2.3 Apport en acides aminés**

Les apports azotés sont nécessaires afin de limiter la dégradation des tissus endogènes et de permettre la croissance et le développement tissulaire. Ils se font sous forme d'un mélange d'acides aminés administré à une concentration de 1 à 1,5 g/kg/j puis augmenté progressivement par palier de 0,5 g/kg/j pour atteindre entre 3 et 4 g/kg/j [39-41].



## 2.2.4 Apport lipidique

Les lipides sont essentiels pour le développement cérébral de l'enfant. De plus, ils représentent l'autre forme d'apport en énergie non protéique. La clearance lipidique chez le prématuré étant faible, ces émulsions sont administrées de façon contrôlée; le démarrage des apports s'amorce doucement à 0,5 g/kg/j et continue par palier de 0,5 g/kg/j jusqu'à arriver à une phase de stabilisation en Europe de 2 g/kg/j mais qui se situe plutôt en Amérique du Nord, entre 4,5 et 6,8 g/kg/j [39-41].

La fraction lipidique nous intéresse tout particulièrement dans le cadre de ce travail puisque c'est la peroxydation de ses constituants qui provoquera la génération d'hydroperoxydes lipidiques, dont la fragmentation ultérieure peut conduire à la génération d'aldéhydes réactifs : les 4-hydroxy-alkénals.

Traditionnellement, les émulsions lipidiques sont des triglycérides à longue chaîne issus d'huile de carthame ou d'huile de soja, qui sont émulsifiés par des phospholipides dans le but de mimer la structure des chylomicrons naturels [44]. Elles sont les sources d'AGPI n-6 et d'acides gras saturés à longues chaînes (AGS) que contient la solution de NP [44].

De nouvelles formulations mélangeant les AGPI n-6 avec des acides gras monoinsaturés à chaîne moyenne (AGM) provenant des huiles d'olive ont fait leur apparition depuis quelques années. La particularité de celles qui combinent les triglycérides à longue chaîne avec les triglycérides à chaîne moyenne se situe au niveau de leur clearance plasmatique plus rapide. Les huiles de poissons sont quant à elles enrichies en AGPI à longue chaîne n-3. Le tableau 2 ci-dessous présente un aperçu des émulsions disponibles commercialement, leur contenu en huiles et leur composition en acides gras.

Produit Compagnie	Intralipid® Baxter Healthcare / Fresenius Kabi	Lyposyn II® Hospira	ClinOleic® Baxter Healthcare / Parenteral SA	SMOF Lipid® Fresenius Kabi	Omegaven® Fresenius Kabi
<i>Source (en g)</i>					
Huile de soja	10	5	2	3	0
Huile de tournesol	0	5	0	0	0
TCM	0	0	0	3	0
Huile d'olive	0	0	8	2,5	0
Huile de poisson	0	0	0	1,5	10
α-Tocopherol (mg/L)	38	0	32	200	150-296
<i>Acide gras</i>					
Acide linoléique	5	6,5	0,9	2,9	0,1 – 0,7
Acide α-linoléique	0,9	0,4	0,1	0,3	< 0,2
EPA	0	0	0	0,3	1,28 – 2,82
DHA	0	0	0	0,05	1,44 – 3,09
Acide oléique	2,6	1,8	0,8	2,8	0,6 – 1,3
Acide palmitique	1	0,9	0,7	0,9	0,25 - 1

Tableau 2 : Composition de 5 émulsions lipidiques disponibles dans le commerce d'après Meisel et al [45]

## 2.2.5 Apport en vitamines

Les services hospitaliers utilisent différents types de solutions de multivitamines, contenant des vitamines lipo-, hydrosolubles et plusieurs oligoéléments. Leurs compositions sont fondamentalement semblables, même si des différences de concentrations des différentes molécules peuvent apparaître.

### ▪ Les vitamines liposolubles

#### *La vitamine D*

L'apport total de vitamine recommandé pour l'alimentation parentérale et entérale se situe entre 40 et 120 IU par jour chez les nourrissons de moins de 1 000 g à la naissance et de 40 à 260 IU par jour pour les nourrissons de 1 000 g ou plus à la naissance [46].

### *La vitamine A*

On recommande d'ajouter 500 g/kg de vitamine A par jour à la préparation pour la nutrition parentérale [46]. Il n'est pas recommandé d'administrer d'autres suppléments de vitamine A. Pendant la période de croissance stable, l'apport en provenance du lait humain se situe sous la quantité jugée nécessaire pour maintenir une concentration sérique normale.

Dans le cas des enfants alimentés à l'aide de préparations pour prématurés, leur besoin dépend de la concentration de vitamine A dans la préparation et du volume ingéré.

### *La vitamine E*

Bien qu'il n'existe aucun avantage clinique démontré d'administrer des suppléments aux prématurés, il semble prudent de maintenir les concentrations de vitamine E dans le plasma entre 10 et 30 mg/L, et un ratio d' $\alpha$ -tocophérol de 1 mg ou plus par gramme de lipides totaux. Pendant la période de transition, les nourrissons sont placés sous nutrition parentérale, pour laquelle un apport de 2,8 mg/kg par jour semble suffire [46].

### *La vitamine K*

En 1983, le comité sur le fœtus et le nouveau-né de la Société canadienne de pédiatrie recommandait que tous les prématurés et les nourrissons malades reçoivent une injection intramusculaire de 1 mg de vitamine K<sub>1</sub> dans les six heures suivant la naissance, afin de prévenir le syndrome hémorragique du nouveau-né. Les données portant sur l'efficacité d'une dose unique ou multiples de vitamine K administrées par voie orale ne concordent pas, contrairement à l'injection intramusculaire chez les nourrissons à terme [47].

Les nourrissons sous nutrition parentérale doivent recevoir de 2 à 100 g/kg de vitamine K par jour jusqu'à ce qu'ils commencent à s'alimenter par voie orale [46].

- **Les vitamines hydrosolubles**

Peu d'informations sont réellement disponibles concernant les doses optimales de vitamines hydrosolubles à administrer à un enfant prématuré. Au meilleur des connaissances actuelles, ces évaluations s'avèrent sécuritaires. Les apports suivent essentiellement les lignes directrices de guides pédiatriques de différentes sociétés telles que *l'American Society for Clinical Nutrition* ou encore *l'European Society for clinical nutrition and metabolism of gastroenterology*. Des recherches supplémentaires sont donc nécessaires afin d'établir les apports vitaminiques optimaux.

## **2.2.6 Apport en oligoéléments et minéraux**

- Les oligoéléments essentiels du point de vue alimentaire sont le zinc, le cuivre, le sélénium, le chrome, le manganèse, le molybdène et l'iode. Les rapports publiés au sujet des carences minérales des prématurés ne portaient que sur six de ces éléments. Cependant, ces nourrissons courent un risque accru de souffrir de carences en oligoéléments en raison de leurs réserves peu élevées à la naissance, d'une croissance postnatale très rapide et d'un apport variable. La quantité d'oligoéléments contenue dans le lait humain constitue l'étalon de ce que requiert un nourrisson à terme, pourvu qu'il ingère un volume de lait suffisant. Cependant, chez les prématurés, il n'existe aucun étalon, mais trois objectifs acceptables pour établir l'apport à privilégier : la prévention de carences en oligoéléments, la reconstitution des réserves qui auraient normalement été déposées dans le fœtus en développement pendant le troisième trimestre, et l'évitement d'apports excessifs, qui pourrait causer des effets toxiques.

- Il est recommandé d'assurer un apport en **zinc** de 6,5 mol/kg par jour [48].

- Les apports recommandés en **cuivre** s'élèvent à 0,3 mol/kg par jour [46, 48]. Les nourrissons souffrant de cholestase ne peuvent recevoir de cuivre par voie parentérale, car l'excrétion biliaire représente alors la principale voie d'excrétion.

- L'apport en **sélénium** devrait équivaloir à celui qui est contenu dans le lait humain. On peut omettre d'ajouter du sélénium aux solutions utilisées pour l'alimentation parentérale totale. Toutefois, pendant la période de croissance stable, la NP totale doit procurer de 0,02 à 0,025 mol/kg de sélénium par jour. Comme le sélénium est surtout excrété par les reins, il faut réduire les quantités si le débit rénal du nourrisson diminue [46].

- On a rapporté trois cas de carence en **chrome** chez des adultes sous NP totale pendant une longue période, laquelle ne contenait pas de chrome. Cependant, aucune carence de ce genre n'a été détectée chez le nourrisson. Il n'existe aucune information sur la quantité de chrome contenue dans le lait humain des mères ayant accouché avant terme, mais puisque que les prématurés nourris au lait de leur mère ne développent pas de carence en chrome, selon toutes probabilités, cet apport suffit. De même, puisque les nourrissons alimentés à l'aide de préparations contenant des concentrations en chrome plus élevées que celles qu'on retrouve dans le lait humain n'ont souffert d'aucun effet toxique manifeste, la quantité inoffensive correspond probablement à un vaste spectre. Il est recommandé de procurer sous NP totale 3,8 nmol/kg de chrome par jour [46].

- L'alimentation parentérale totale doit procurer journallement 0,02 mol/kg de **manganèse**. Ayant été incriminé sur base de modèles expérimentaux dans l'apparition de la cholestase transitoire de l'enfant [49], il est recommandé de ne pas l'inclure dans les solutions pour NP des nourrissons [46, 50].

- Il est recommandé d'ajouter 2,6 nmol/kg de **molybdène** par jour seulement si le nourrisson doit être placé sous NP totale pendant une longue période [46].

- La plupart des nourrissons sous NP sont nettoyés à l'aide de solutions désinfectantes et détergentes contenant de l'iode et l'on peut supposer qu'une importante quantité d'iode est absorbée par voie cutanée. En tenant compte de cette hypothèse, l'apport parentéral d'iode s'élève à 8 nmol/kg par jour [51].
- Les besoins usuels du prématuré se situent surtout au niveau du **sodium** du fait de l'immaturation de la fonction rénale. La natrémie doit être conservée entre 135 et 145 mM [39, 40, 52, 53].
- La **calcémie** doit être maintenue autour de 2,5 mM, la **phosphorémie** n'étant pas très éloignée à 2 mM [39, 40, 52, 53].

### 2.3 Transition vers une nutrition entérale

La nutrition parentérale répond à une urgence, la nécessité d'un apport nutritionnel optimal. Cependant, lorsqu'elle est exclusive et maintenue, elle finit par poser de graves problèmes. Plusieurs corrélations entre données cliniques et histologiques hépatiques ont en effet suggéré la progression chronologique des lésions hépatiques notamment avec la durée de la NP. L'absence de nourriture dans le tractus gastro-intestinal conduit en effet à une atrophie des villosités, une diminution de la production de mucus intestinale ainsi qu'à une baisse des niveaux d'enzymes de la digestion et de l'absorption des nutriments [54]. De la même façon, une diminution des hormones trophiques produites dans la bouche, l'estomac et l'intestin est également observée [54]. Des déficits immunitaires peuvent également se développer à cause de la baisse des niveaux des immunoglobulines A muco-sales (qui protègent le nouveau-né des germes environnementaux [55]) produites par les plaques de Peyer, entraînant une attraction accrue de cellules polynucléaires libérant plusieurs médiateurs de l'inflammation [56]. Ces changements ont pour conséquence l'augmentation de l'incidence et de la sévérité du syndrome inflammatoire que l'on peut rencontrer chez ces nouveau-nés [57]. En favorisant un terrain pro-inflammatoire propice sans protection

mucosale, ces déficits facilitent le développement par la suite, de l'entérocolite nécrosante lors de l'introduction d'une nutrition lactée.

Démarrer une nutrition entérale le plus rapidement possible apparaît alors indispensable. Il a été démontré dans le cadre de plusieurs études animales que la nutrition entérale amorcée de façon précoce diminue l'incidence des problèmes décrits ci-dessus [58]. Ces résultats se vérifient plus particulièrement lorsque le colostrum et le lait humain ont été utilisés, à raison de faibles quantités de l'ordre de 5 à 25 ml/kg/jour [59]. On parle alors de nutrition entérale minimale ou *minimal enteral feeding*. Le but n'étant pas que celle-ci soit une source primaire de nutriments mais qu'elle permette d'amener l'intestin grêle à maturation, de diminuer les concentrations plasmatiques de bilirubine et de raccourcir les durées d'hospitalisation [59-62].

La majorité des études s'accordent à dire que le lait humain est considéré comme la source de nutrition entérale optimale. Il permet non seulement une meilleure protection face aux problèmes d'entérocolite nécrosante [63, 64] mais aussi et surtout une stimulation de la maturation du tractus gastro-intestinal [65], contrairement aux formules de lait; ceci pourrait être expliqué par la présence de cytokines telles que le facteur de croissance Beta (TGF- $\beta$ ) et le facteur de croissance de l'épiderme (EGF) [66]. Il présente également l'avantage, toujours en comparaison avec les formules, de comporter un nombre important de composés à fonction biologique non nutritionnelle. Les immunoglobulines, et particulièrement la classe A, y sont abondantes [67]. La lactoferrine, outre sa capacité à trapper le fer et le rendre indisponible aux pathogènes [68], possède également une activité bactéricide [69], antivirale [70] et même anti-inflammatoire [71]. Les oligosaccharides et les glycoconjugués tels que les mucines et lactadhérines participent aussi à l'activité antibactérienne [72, 73]. La caséine fait partie de ces molécules biologiques qui en plus de leurs caractéristiques nutritionnelles, ont une activité biologique secondaire. Elle présente en effet la particularité de libérer lors de sa digestion, des peptides appelés casomorphines aux propriétés immunomodulatrices [74]. Il a été également montré en dehors de l'aspect

immunomodulateur et antibactérien, que le lait humain confère aussi une meilleure protection antioxydante, en comparaison avec le lait de formule [75].

## 2.4 Administration de la NP

Les composés de la NP que nous venons de décrire sont délivrés à l'enfant prématuré suivant un protocole précis mais qui peut différer d'une part selon les pays et d'autre part selon les recommandations suivies par les services hospitaliers. On distingue surtout deux types d'administration : le « 2 en 1 », ou *système en Y*, et le « 3 en 1 », ou *all in one* :

- Le « 2 en 1 » est un système qui mélange ensemble les constituants à l'exception de l'émulsion lipidique qui est infusée séparément. Les deux solutions se mélangent près du site d'injection, d'où la terminologie de *système en Y*. Cette option permet de protéger l'émulsion lipidique de la peroxydation [38, 76].

- Le « 3 en 1 » est un système dans lequel tous les constituants sont mélangés, sans exception [38]. Le problème de ce type d'infusion est que les lipides sont en contact avec les autres molécules. Le fait de mettre en présence de potentiels donneurs d'hydrogène tels que les acides gras avec des molécules oxydantes, peut en effet provoquer des réactions de dégradation lipidique que l'on connaît sous le terme de 'peroxydation lipidique'. Ces réactions seront détaillées dans les prochains paragraphes (section 2.5).

La préoccupation majeure est la stabilité des solutions et celle en particulier, de l'émulsion lipidique. Cependant, il existe d'autres problèmes inhérents à la NP, comme la formation de globules lipidiques dont le diamètre excède la norme des 5  $\mu\text{m}$  (induisant une embolie graisseuse secondaire à une obstruction des vaisseaux pulmonaires et systémiques [77, 78]), la précipitation de sels insolubles et la dégradation de vitamines et d'acides aminés [79]. Mais dans le cadre de mon projet de doctorat, nous sommes restés focalisés



sur l'émulsion lipidique et les questions qui se posent suite à son administration dans les conditions cliniques, selon les deux modes préalablement décrits.

## 2.5 Exposition lumineuse de la NP

Il est très surprenant voire même choquant, de constater que les efforts faits au niveau de la stabilité physicochimique des solutions constituant la NP sont quasiment réduits à néant lorsque l'on se rend compte qu'en terme de chimie réactionnelle, la NP se résume à :

- Un ensemble de molécules possédant des pH de stabilité différents,
- Des caractéristiques oxydo-réductrices différentes,
- Des molécules photoexcitables,
- De l'oxygène dissout.

En effet, ce mélange est réactif proposé tel quel. Il est donc difficilement concevable de penser que la solution ne soit pas protégée de la lumière, tout comme les produits chimiques (photo)oxydables utilisés en recherche. La lumière va effectivement jouer un rôle fondamental dans les processus de peroxydation que nous allons détailler ici.

### 2.5.1 La riboflavine comme photosensibilisant

Un photosensibilisant est une molécule susceptible de transférer un excès d'énergie emmagasinée sous forme photonique afin de retrouver son état énergétique fondamental stable [80]. Plusieurs molécules du cocktail de la NP répondent à cette définition, en particulier la riboflavine (Rf) qui est une des composantes du mélange multivitaminique. Même si elle est indispensable pour l'organisme (elle permet la biosynthèse *in vivo* des flavoprotéines FAD et FMN [81]), elle est caractérisée par cette capacité à être photo-excitée par la lumière visible ambiante [82]. En passant à un niveau énergétique supérieur,

et donc par définition instable, la Rf va transmettre son excès d'énergie à d'autres molécules environnantes : l'oxygène moléculaire et l'acide ascorbique dans le cas qui nous concerne (Figure 1).

La Rf excitée transfère son énergie à l'oxygène moléculaire dissout pour le convertir en oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) très réactif [83]. On appelle communément cette réaction une photo-oxydation de type II. Mais elle est également capable, au cours d'une réaction de photo-oxydation de type I, de transférer ses électrons à une autre molécule en solution, à savoir l'acide ascorbique, qui est alors converti en radical ascorbate anionique [84].

A l'issue des réactions de type I et II, la molécule de Rf revient à son état énergétique stable en réduisant une nouvelle fois, une molécule d'oxygène dissoute pour former un anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ). Par conséquent, le retour à cet état stable passe par la génération de deux espèces radicalaires :  $\text{O}_2^{\bullet-}$  et le radical ascorbate, et d'une espèce réactive particulièrement électrophile :  $^1\text{O}_2$  (Figure 1).

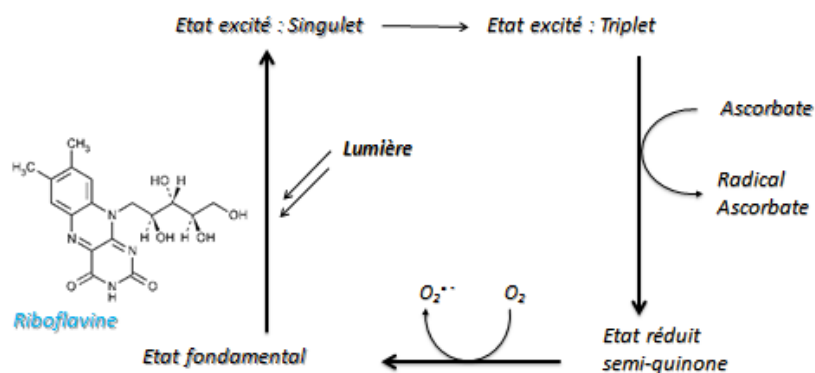
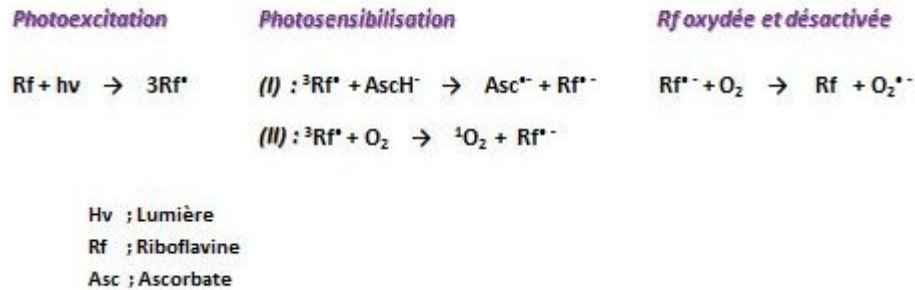
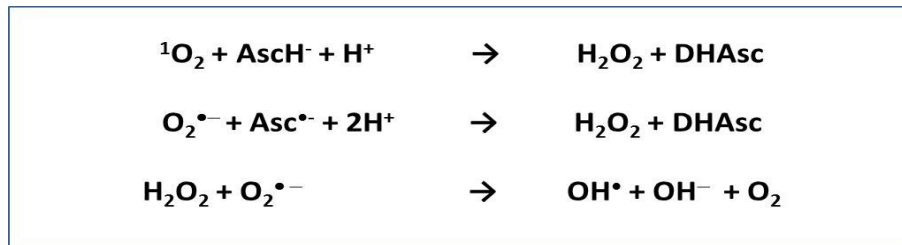


Figure 1 : Mécanisme d'excitation de la riboflavine en solution d'après Cardoso et al [85]



*Figure 2 : Réactions de photo-oxydation de type I et II d'après Cardoso et al [85]*

La lumière va donc de cette façon, pouvoir affecter considérablement la qualité de l'émulsion lipidique; les espèces radicalaires vont potentiellement pouvoir arracher des protons aux chaînes aliphatiques des AGPI et conduire à la formation d'hydroperoxydes lipidiques instables. Mais en réagissant entre elles, les molécules néoformées vont aboutir à la génération de deux nouvelles entités; le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle ( $\bullet OH$ ), considéré comme l'espèce radicalaire oxydante la plus puissante [86, 87].



*Figure 3 : Génération du peroxyde d'hydrogène et du radical hydroxyle en solution d'après Cardoso et al [85].*

Les mécanismes indiqués ont été clairement mis en évidence dans différentes études dont la dernière en date de Cardoso *et al*, résume parfaitement l'implication de la Rf excitée dans la génération d'espèces radicalaires [85].

L'effet lumière a donc des conséquences directes sur la stabilité des émulsions lipidiques. Il faut également signaler qu'elle a par la même occasion des effets directs sur la stabilité de vitamines comme l'acide ascorbique à cause du processus de réduction de la Rb excitée. L'élévation de température joue également un rôle important dans la dégradation de ces éléments [88].

### 2.5.2 La peroxydation lipidique

La peroxydation des AGPI conduit à la formation d'hydroperoxydes instables. Ces molécules peuvent être infusées chez le prématuré, ou alors se fragmenter et générer d'autres molécules dont nous reparlerons par la suite : les 4-hydroxy-alkenals, dont le *trans*-4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) fait partie.

Le processus physicochimique de peroxydation et de réarrangement sera étudié en détails plus loin, mais ce qu'il faut retenir ici, c'est que la NP peut potentiellement générer des molécules dont les propriétés biologiques ont été clairement démontrées [16, 89].

### 2.5.3 Alternatives

Pour tenter de contrer l'effet lumière, le mélange des lipides avec des molécules anti-oxydantes a fait son apparition. C'est le cas de solutions commerciales dans lesquelles est ajouté de l' $\alpha$ -tocophérol sous forme libre. De plus, les multivitamines contiennent des molécules anti-oxydantes telles que les vitamines C et le tocophérol sous forme lié à un acétate. Les études menées par Silvers et Winterbourn ont permis de démontrer que mélanger les multivitamines avec l'émulsion lipidique pouvait protéger cette dernière de la peroxydation [90, 91]. Suivant ces indications, les recommandations européennes préconisent, lors d'une administration « 2 en 1 », d'ajouter les multivitamines à l'émulsion lipidique délivrée séparément [92]. Dans le cadre de nos travaux, cette formulation où les multivitamines sont mélangées avec les lipides sera appelée **MV-LIP**. Les recommandations américaines conseillent quant à elles d'introduire les lipides seuls, sans

multivitamines [93]. Cette formulation dite formulation nord-américaine, sera appelée **MV-AA**.

Une autre alternative serait d'isoler la NP de la lumière, mais pour des raisons essentiellement pratiques, ceci est très difficilement réalisable. En effet, plusieurs unités de néonatalogie ont pris soin de protéger les sacs contenant les solutés de la NP (et ceci dès la fabrication en pharmacie), mais très souvent, la tubulure restant exposée, la protection n'est pas totalement efficace. Il est donc important de trouver d'autres solutions pour permettre le maintien de la stabilité de la NP.

## **2.6 Les complications associées à la NP**

L'enfant prématuré nourri par NP reçoit donc par voie intraveineuse des hydroperoxydes lipidiques, du peroxyde d'hydrogène et plusieurs espèces radicalaires. La présence en grandes quantités de ces molécules est associée à des complications métaboliques, pulmonaires et hépatiques.

Kljuchnikov a démontré que l'infusion de peroxydes lipidiques issus de la peroxydation des émulsions lipidiques de la TPN entraîne une utilisation de lipides oxydés et une fragilisation des membranes réticulocytaires chez le prématuré [94].

Au niveau pulmonaire, Lavoie *et al* ont clairement mis en évidence l'impact de la NP sur le développement de la bronchodysplasie pulmonaire, pathologie se caractérisant par un arrêt du développement alvéolaire et vasculaire [8]. Dans un modèle animal de nutrition parentérale, la NP provoque un remodelage cellulaire caractérisé notamment par un potentiel redox pulmonaire davantage oxydé et augmentation de l'ARNm du procollagène [95-97]. Chez l'humain, les données cliniques associant sévérité de la bronchodysplasie pulmonaire et l'absence de photo-protection de la NP vont également dans le même sens [6].

Il est plus difficile de cibler une cause aux complications hépatiques qui sont multifactorielles. Il semble toutefois que chez l'humain, l'émulsion lipidique et plus particulièrement sa nature, y soit davantage associée. Dans une étude montrant le développement d'une cholestase à la suite d'une mise sous NP contenant des huiles de soja, le fait de les remplacer par des huiles de poisson riches en acides eicosapentaénoïque et docosahexaénoïque a permis le rétablissement de la sécrétion biliaire [11]. Les conclusions de cette étude doivent toutefois être prises avec une certaine réserve puisqu'elle ne portait que sur deux individus. Cette complication que l'on nomme cholestase est relativement fréquente et régresse lorsque l'alimentation entérale est progressivement mise en route avec un arrêt en parallèle de la NP.

La stéatose est l'autre grande problématique hépatique; elle se manifeste par une rétention et une accumulation de lipides dans les hépatocytes, causant lipotoxicité, inflammation et fibrose [98]. La responsabilité de la NP a été démontrée et le peroxyde d'hydrogène a été exclu comme source potentielle des problèmes hépatiques [99]. Les causes exactes ne sont toutefois pas encore claires aujourd'hui; il est difficile de savoir si c'est l'excès de lipides / glucides infusés, les molécules toxiques générées dans l'émulsion lipidique ou la combinaison des deux qui sont à l'origine du processus.

La mise en circulation d'espèces chimiques réactives va également entraîner des processus d'oxydation chez le prématuré. La NP se comporte comme un vecteur de sources oxydantes qui peuvent avoir des effets délétères dans un organisme qui présente des défenses anti-oxydantes immatures. Il ne peut donc pas se défendre adéquatement contre l'injure oxydante de la NP. Dans le chapitre suivant, nous expliquerons pourquoi et comment ces métabolites peuvent avoir des effets biologiques chez ces enfants.

### 3 Métabolites d'oxydation et stress oxydant

#### 3.1 Les radicaux libres et les produits secondaires d'oxydation

##### 3.1.1 Qu'est-ce qu'une espèce radicalaire?

De la dissociation de 2 atomes par coupure homolytique résulte la formation de molécules très réactives, possédant un électron non apparié : les radicaux libres. Ces molécules possèdent une géométrie spécifique qui oscille entre un carbocation (plan) et un carbanion (tétraédrique). Cette propriété a pour effet de conférer une certaine stabilité au radical; plus le radical est substitué, plus il est maintenu par résonance (hyperconjugaison) sous forme stabilisée, comme pour les carbocations.

Lorsque l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) est soumis à une réduction, il y a formation de radicaux libres oxygénés, que l'on appelle **espèces réactives** dérivées de l'**oxygène** (ERO). Sous l'appellation ERO sont inclus tous les radicaux oxygénés comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le radical hydroxyle ( $\bullet OH$ ), le radical peroxyde ( $ROO^{\bullet}$ ), le radical alcoxyde ( $RO^{\bullet}$ ) ou le monoxyde d'azote  $NO^{\bullet}$  (que l'on classe aussi dans les espèces réactives de l'azote). Le peroxyde d'hydrogène est également considéré comme une ERO même si la molécule n'est pas radicalaire (voir plus loin).

##### 3.1.2 Formation des ERO

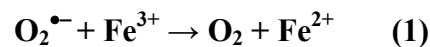
La formation des ERO est un processus physiologique normal résultant du métabolisme aérobie de l'organisme. Leur production est essentiellement d'origine enzymatique, soit la NAD(P)H oxydase membranaire et le complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire.

**L'anion superoxyde**  $O_2^{\bullet-}$  est issu de l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire. Il est produit par les NADPH oxydase (NOx) présentes dans les phagocytes

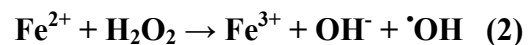
activés tels que les neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les éosinophiles durant la réponse immunitaire [100, 101], mais aussi dans les cellules endothéliales, vasculaires, les cellules musculaires lisses et les polynucléaires dans le cadre de l'athérosclérose [102].

Dans la mitochondrie, lors de la phosphorylation oxydative, des électrons produits par les complexes I et III peuvent s'échapper de la chaîne de transporteurs d'électrons et conduire à la formation d'anion superoxyde [103, 104]. Ce dernier est également formé au niveau du peroxyosome lors des oxydations successives de la xanthine en hypoxanthine puis en urée par des xanthine oxydases.

$O_2^{\bullet-}$  est un radical libre qui se comporte comme un nucléophile capable de modifier certaines structures moléculaires. Il peut réagir avec les groupements thiols pour former un radical sulfinyle [105] mais la vitesse de réaction est trop lente pour entrer en compétition avec les superoxyde dismutases (SOD). Seules les protéines Fer/sulhydrlées peuvent réagir rapidement avec  $O_2^{\bullet-}$ , ce qui conduit à leur inactivation. On parle alors de toxicité des superoxydes [106].  $O_2^{\bullet-}$  peut réagir spontanément avec lui-même pour former du peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène, ce qui explique son caractère peu stable en solution aqueuse. Cette réaction, appelée réaction de dismutation, est thermodynamiquement possible mais reste limitée en dehors des peroxyosomes. Selon les travaux de Bielski, l'anion  $O_2^{\bullet-}$  n'est toutefois pas particulièrement réactif *in vivo* [107, 108]. La toxicité de l' $O_2^{\bullet-}$  et du  $H_2O_2$  proviendrait de leur conversion en radical hydroxyle  $\bullet OH$  en présence de métaux de transition (*réaction 1*).

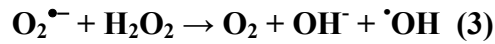


La réduction du fer ferrique est suivie d'une réaction de Fenton (*réaction 2*);





Ces 2 réactions groupées portent le nom de réaction d'Haber-Weiss (*réaction 3*):



L'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ne présente donc pas une grande réactivité, mais va conduire à la formation d'espèces secondaires beaucoup plus réactives.

**Le radical hydroxyle  $\text{}^{\bullet}\text{OH}$**  est formé lors de la réaction de Fenton décrite précédemment entre un métal de transition et le peroxyde d'hydrogène. C'est l'ERO qui possède la plus grande réactivité, avec une demi-vie extrêmement courte de  $10^{-9}$  sec [109]. Il agit à proximité de son site de production et peut potentiellement interagir avec toutes les molécules biologiques. Son mode d'action consiste à arracher un proton d'une autre molécule et ainsi contribuer à la propagation de la réaction radicalaire. Toutefois, si la réaction de Fenton générant le radical hydroxyle existe et a été démontré *in vitro*, sa pertinence dans les conditions biologiques reste questionnée. Les métaux de transition sont en effet en grande majorité séquestrés et la probabilité de rencontrer une forme métallique libre est faible [110]. Cependant, *in vivo* en condition de stress, un excès d'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$  peut libérer le fer contenu dans certaines protéines telles que les clusters 4Fe-4S d'enzymes telles que les déshydratases/lyases [111]. Les métaux de transition deviennent alors disponibles pour une réaction d'Haber-Weiss qui engendrera la formation d'un radical hydroxyle [111].

Du fait de son caractère non radicalaire, **le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$**  est un cas particulier. Il sera traité plus longuement dans la section traitant des métabolites générés dans la nutrition parentérale (section 3.3.2.1).

### 3.1.3 Formation des espèces radicalaires de l'azote (ERA)

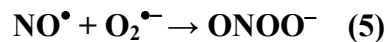
Malgré leur classification distincte, les espèces réactives de l'azote dérivent des ERO (à l'exception du NO synthétisé par les *nitric oxyde synthases* NOS). L'atome le plus électrophile des ERA reste toujours l'oxygène. Le **NO $\bullet$**  est une molécule produite

physiologiquement lors de l'oxydation enzymatique de l'arginine en citrulline par les NOS constitutives et induites (*réaction 4*) [112, 113].



C'est un radical abondamment produit au sein des cellules endothéliales, vasculaires et neuronales ainsi que dans les macrophages et les neutrophiles, dont l'augmentation est impliquée dans de nombreux processus de régulation comme la neurotransmission, la régulation de la pression sanguine, les mécanismes de défense, la relaxation des cellules musculaires lisses ou encore la régulation de l'immunité [114]. Sa demi-vie n'excède pas quelques secondes dans un environnement aqueux, mais il peut rester stable lorsque la concentration d'oxygène du milieu diminue [115]. Le NO<sup>•</sup> a été à juste titre, décrit comme une molécule extraordinaire du fait de ses multiples effets bénéfiques et de sa très grande capacité à diffuser rapidement dans les membranes et les cytoplasmes [115]. La production de sous-produits à caractère toxique pose toutefois problème.

Lors de la réponse immunitaire, les phagocytes sont capables de produire du NO<sup>•</sup> grâce à l'activité de la NOS inductible (iNOS), en même temps que de l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> l'est par les NOx. En réagissant ensemble, ces deux radicaux peuvent former un anion peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>) réactif et toxique (*réaction 5*).



Le peroxy-nitrite est un puissant agent oxydant susceptible d'endommager l'ADN et d'oxyder les lipides [116]. En milieu acide, il est également capable de se décomposer pour former un radical hydroxyle (<sup>•</sup>OH) (*réaction 6*).



Les ERO et ERA sont susceptibles de s'attaquer à une grande variété de composés allant des acides nucléiques aux lipides. Nous nous intéresserons ici plus particulièrement à leurs effets sur les lipides et le déclenchement des phénomènes de peroxydation lipidique.

### 3.1.4 La peroxydation lipidique

Les réactions qui seront traités dans cette section sont spontanées et ne nécessitent pas l'action d'enzymes.

#### 3.1.4.1 Mécanisme de la peroxydation lipidique

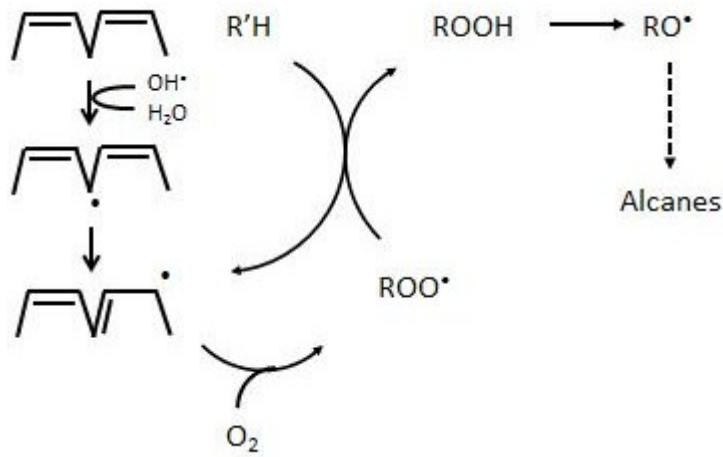
L'oxydation des lipides concerne essentiellement les acides gras polyinsaturés. Du fait de la présence dans leur structure d'hydrogènes bis-allyliques à caractère électrofuge, les AGPI ont une capacité d'autooxydation plus forte que les autres lipides. Plus ils sont insaturés, plus ils sont sensibles à l'oxydation.

L'oxydation des AGPI se déroule en 3 temps : une phase d'initiation, une phase de propagation et une de terminaison.

Lors de **l'initiation**, un proton méthylénique est arraché de l'AGPI par un radical libre. Celui-ci devient alors à son tour radicalaire,  $R^\bullet$ , et est stabilisé par réarrangement électronique.

Le radical  $R^\bullet$  se combine à l'oxygène dissout pour former un radical peroxyde,  $ROO^\bullet$ , durant **la phase de propagation**. Celui-ci réagit ensuite avec un autre acide gras,  $RH$ , en lui arrachant un proton méthylénique, ce qui donne un hydroperoxyde et un nouveau radical,  $R^\bullet$ , est formé. Ce radical alkyle néoformé va permettre à la réaction de se propager. Pour un alkyle formé, une centaine d'hydroperoxydes peuvent théoriquement être générés avant que la réaction ne s'arrête [117]. En pratique, cette séquence peut être perturbée et interrompue par des pièges anti-oxydants endogènes tels que les ubiquinones

ou les tocophérols. Un hydroperoxyde est une structure moléculaire instable qui se décompose (en présence de métaux de transition) en radicaux alcoxytes,  $RO^\bullet$ ,  $ROO^\bullet$ , ou encore en 4-hydroxy-alkénals [118]. La peroxydation s'arrête lorsque le radical  $R^\bullet$  s'associe à un autre radical  $ROO^\bullet$  ou  $R^\bullet$ . **La phase de terminaison** se conclut donc par la formation d'une molécule non radicalaire stable.



*Figure 4 : Phase d'initiation de l'oxydation des AGPI, de propagation et de terminaison radicalaire entraînant la formation d'un radical peroxyde, puis d'un hydroperoxyde qui après fragmentation, produira des aldéhydes et des alcanes.*

### 3.1.4.2 Produits d'oxydation primaire

Les radicaux  $R^\bullet$ ,  $ROO^\bullet$  et les hydroperoxydes font partie des métabolites d'oxydation primaires générés. En modifiant les lipides, c'est l'ensemble des interactions hydrophobes lipides-lipides et lipides-protéines dans les membranes biologiques qui sont affectées. En perturbant la fluidité membranaire (les lipides modifiés ne s'agréant plus correctement entre eux) et en augmentant la perméabilité par perte d'acides gras, ces métabolites d'oxydation primaire affectent le fonctionnement des enzymes et protéines à localisation membranaires [119].

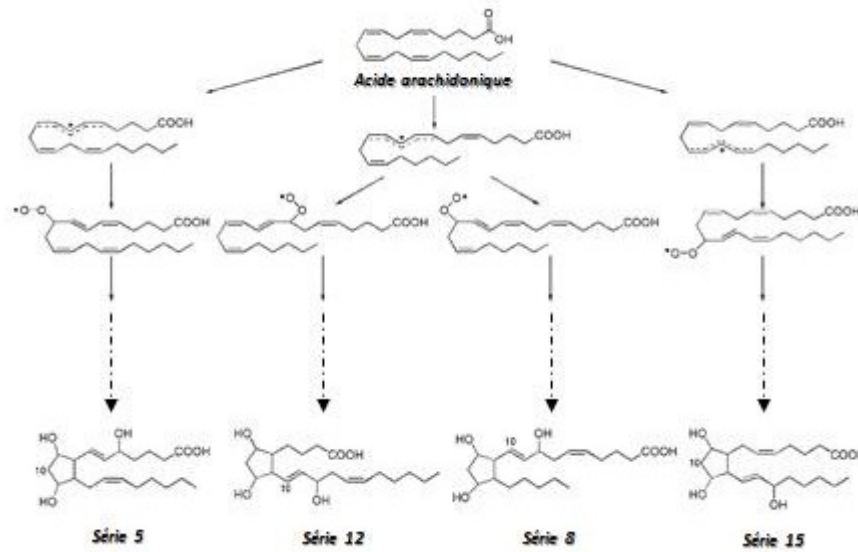
### 3.1.4.3 Produits d'oxydation secondaire

Les produits d'oxydation secondaire sont en partie représentés par les aldéhydes lipidiques. Il en existe une grande variété de molécules détectables et quantifiables sous formes libres, ou liées sous forme d'adduits. Le choix des marqueurs de la peroxydation lipidique est la résultante de la pertinence biologique de la molécule au cœur d'une problématique donnée et de la disponibilité des méthodologies. Le malondialdéhyde (MDA) fait partie des marqueurs de stress oxydant les plus utilisés. Il n'a toutefois pas été choisi dans notre projet parce qu'il ne répondait pas aux critères d'effets biologiques que nous développerons par la suite. Nous avons donc choisi d'étudier le comportement des 4-hydroxy-alkénals. Ces molécules proviennent de la  $\beta$ -scission des hydroperoxydes lipidiques décrits précédemment [120]. Le plus connu est le *trans*-4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), un aldéhyde issu de la peroxydation des AGPI de la série n-6 et surtout des acides arachidonique et linoléique [16, 119]. Le *trans*-4-hydroxy-2-hexenal (4-HHE) provient quant à lui de la peroxydation des AGPI de la série n-3 et plus particulièrement de l'acide docosahexaénoïque [121]. Les mécanismes de formation et les effets de ces deux molécules seront traités de façon plus approfondie dans les sections 3.3.2.2 et 3.3.2.3.

En dehors de la fragmentation des hydroperoxydes, la peroxydation des AGPI de la série n-6 par les radicaux libres peuvent générer des composés « *prostaglandin-like* » : les isoprostanes (IsoPs). La première classe mise en évidence est celle des F<sub>2</sub>-isoprostanes, ainsi nommée du fait de leur analogie avec les F<sub>2 $\alpha$</sub>  prostaglandines (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) au niveau du noyau prostané de type F. Un mécanisme de formation des isoprostanes, basé sur la formation d'un bicycloendoperoxyde à partir de l'acide arachidonique C20:4, a été proposé par *Prior et al* dès 1990 [17]. L'attaque radicalaire de l'acide arachidonique C20:4 entraîne une perte d'hydrogène bis-allylique, suivie de l'addition d'un oxygène qui forme un radical peroxy (en position 9, 8, 12 ou 11). Contrairement aux hydroxyalkénals dont l'hydroperoxyarachidonique devient un radical alcoxy, la formation du radical peroxy est tout de suite suivie d'une 5-exocyclisation. Le réarrangement électronique qui s'en suit permet à une seconde molécule d'oxygène de réagir avec le carbone devenu radicalaire (en

position 5, 12, 8 ou 15) pour former un bicycloendoperoxyde instable qui, après réduction, formera potentiellement 4 séries de F<sub>2</sub>-isoPs (la série 5, 12, 8 et 15, Figure 6).

La différence essentielle entre les F<sub>2</sub>-isoPs néoformées et les PGF<sub>2α</sub> réside dans l'orientation de la chaîne latérale qui est en position *cis* dans les F<sub>2</sub>-isoPs et en position *trans* dans les PGF<sub>2</sub> [122, 123]. Il est également important de mentionner que la génération des PGF<sub>2α</sub> se fait exclusivement à partir de molécules d'acide arachidonique libre, alors que les F<sub>2</sub>-isoPs sont générées sous formes estérifiées avant d'être libérées par l'action des phospholipases A<sub>2</sub> [124, 125].

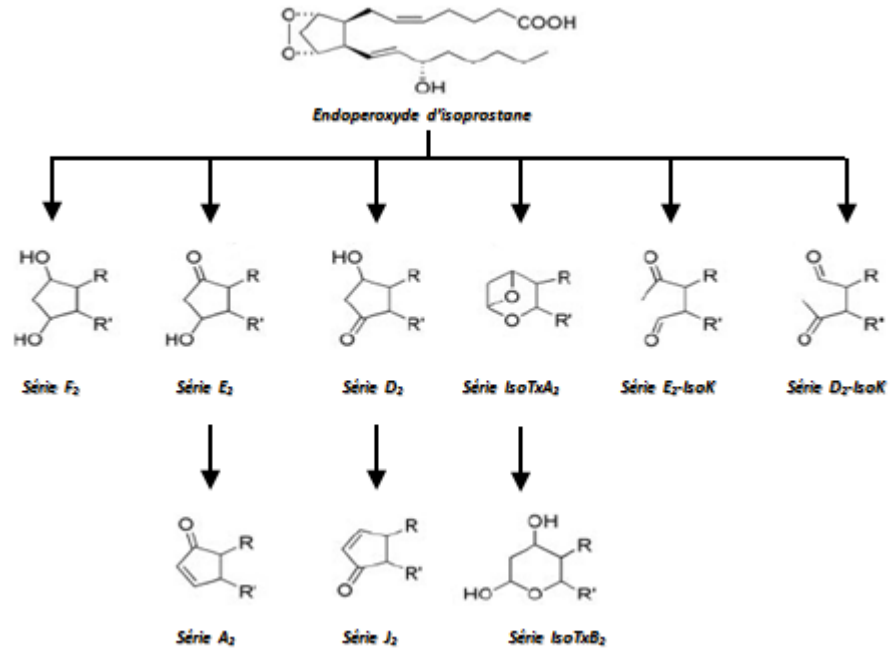


**Figure 5 : Mécanisme de formation des séries 5, 12, 8 et 15 des F<sub>2</sub>-isoprostanes d'après Roberts et al [126]**

Les F<sub>2</sub>-IsoPs sont des molécules biologiquement actives. De par leur structure orientée *cis*, elles ont des effets délétères sur l'intégrité et la fluidité membranaire [127]. Il a été démontré qu'elles pouvaient avoir un effet vasoconstricteur au niveau de différents tissus. Ce phénomène est associé à l'induction de la libération d'endothéline et la prolifération des cellules musculaires lisses [128]. Elles peuvent se lier aux récepteurs des thromboxanes [128].

En fonction de la substitution du noyau prostane, différentes classes d'isoprostanes peuvent également être formées [129-132].

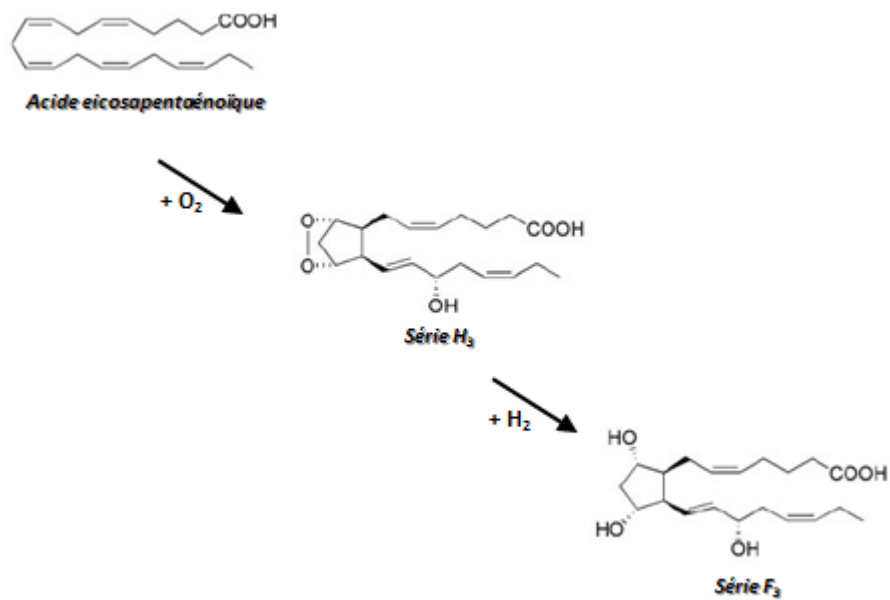
- Quantitativement par rapport à la série F<sub>2</sub>, ce sont les isomères E<sub>2</sub> et D<sub>2</sub> (figure 7) qui sont les plus produits [130] et comme les F<sub>2</sub>-isoPs, se comportent comme des ligands du récepteur des thromboxanes [130].
- Les E<sub>2</sub>/F<sub>2</sub> IsoPs peuvent par la suite subir une déshydratation qui donnera les séries A<sub>2</sub> et J<sub>2</sub> (figure 7). Particulièrement actives, les A<sub>2</sub>/J<sub>2</sub> IsoPs sont capables d'induire une apoptose neuronale et d'accélérer la dégénérescence neurale sur des cultures corticales de rat enrichies en neurones, à des concentrations de l'ordre de 100 nM [131]. De plus, elles peuvent potentiellement inhiber la réponse inflammatoire induite par le lipopolysaccharide, en inhibant la voie du NFκB dans les macrophages [132].
- Une dernière classe de composés peut également être formée : le noyau prostane peut dans certains cas s'ouvrir et donner des molécules « *prostacyclin like* » appelés isolevuglandines ou plus simplement *isoketals* [129]. Elles possèdent une réactivité proche des hydroxy-alkénals et comme eux réagissent avec les résidus lysine des peptides / protéines pour former des adduits covalents.



*Figure 6 : Formation des différents isomères d'isoprostanes formés selon la substitution du noyau prostane d'après Roberts et al [126].*

Les AGPI de la famille n-6 ne sont pas les seuls à pouvoir être à l'origine de molécules telles que les isoPs. Les AGPI n-3 peuvent également après oxydation, en générer et dépendamment du degré d'insaturation, la dénomination des molécules formées variera : la peroxydation de l'acide linoléique C18:3 va générer la série F<sub>1</sub>-IsoPs, celle de l'acide eicosapentaénoïque C20:5 la série F<sub>3</sub>-IsoPs (figure 8) et celle de l'acide docosahexaénoïque C22:6 la série F<sub>4</sub>-neuroprostanes (F<sub>4</sub>-Nps) [133, 134]. La grande différence avec les F<sub>2</sub>-isoPs issues des AGPI n-6 se trouve dans l'activité biologique de ces molécules. En effet, certaines études ont montré que les Nps possèdent des effets différents; par exemple, la série 15-F<sub>3</sub>-IsoP n'affecte pas l'agrégation plaquettaire, contrairement à la série des 15-F<sub>2</sub>-isoPs [135].





*Figure 7 : Formation de la série F<sub>3</sub>-isoprostane, à partir de l'acide eicosapentaénoïque d'après Gao et al [136]*

### 3.2 Les systèmes antioxydants.

Les organismes aérobies disposent de défenses antioxydantes conçues pour réguler la production de radicaux libres et autres produits d'oxydation et limiter l'impact du stress oxydant [137]. Elles se présentent sous forme de composés de nature différente qui agissent de façon synergique et complémentaire, sous forme de catalyseurs enzymatiques ou de molécules antioxydantes.

## 3.2.1 Les antioxydants non enzymatiques

### 3.2.1.1 Le glutathion

Le glutathion réduit est un tripeptide thiolé, le L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinyl-L-glycine, faisant partie des antioxydants hydrosolubles les plus abondants. Il est synthétisé dans le cytoplasme de toutes les cellules, même si sa concentration varie selon le tissu (de l'ordre du  $\mu$ M dans le plasma à plusieurs mM au niveau du foie) [138]. C'est une puissante molécule réductrice susceptible de céder son hydrogène et s'oxyder en dimère de glutathion oxydé (GSSG) [139]. Il est un des principaux antioxydants :

- i) en tant que piègeur, grâce à sa capacité de liaison directe avec les radicaux libres et de détoxification indirecte des oxydants à travers des réactions enzymatiques [140]. Sa fonction thiol,  $-SH$ , exerce une activité nucléophile permettant une liaison à différentes molécules présentant un caractère électrophile marqué (ou partiel, sur une partie de la structure), tel que le 4-HNE [141]. Le produit néoformé est alors dit glutathionylé et peut ensuite être éliminé par la voie des mercapturates *via* une excrétion urinaire, ou dégradé par la voie du protéasome [142];
- ii) en tant que cofacteur de plusieurs enzymes antioxydantes (GPx, GST, voir paragraphes 3.2.2.3 et 3.2.2.4);
- iii) en participant à la détoxification des lipides hydroperoxydés par l'action de la peroxyrédoxine 6 [143]
- iv) en régénérant l' $\alpha$ -tocophérol et l'acide ascorbique sous leur forme active [144]. Au cours de ces réactions, le GSH s'oxyde en GSSG; le recyclage de ce dernier est catalysé en retour par la glutathion réductase (GR) lors d'un processus nécessitant le cofacteur NADPH.

- v) en étant impliqué dans la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et dans la réduction des hydroperoxydes à travers une réaction catalysée par la GPx [145].

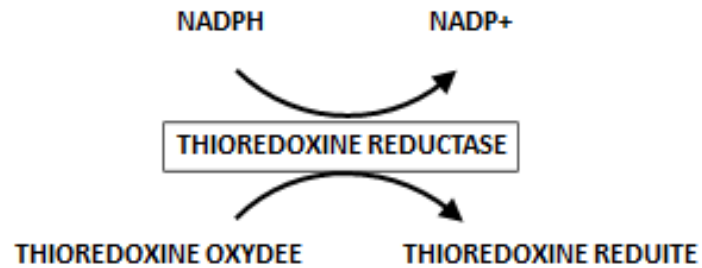
Le couple GSH et GSSG est un acteur important du statut redox cellulaire et constitue un tampon redox majeur (voir paragraphe 3.3.1 ci-dessous).

### **3.2.1.2 Les thioredoxines**

La thiorédoxine (Trx) est un peptide ubiquitaire de 10 à 12kD. Elle est qualifiée de dithioldisulfide oxydoréductase, catalysant la réduction des dissulfides en sulfhydriles correspondant. Sa régénération intervient grâce à l'action d'une thiorédoxine réductase (Trx-R), une sélénoprotéine dépendante du NADPH.

Deux isoformes sont présentes chez les mammifères; la Trx1 cytosolique et nucléaire et la Trx2, mitochondriale. Leur fonction est de maintenir les résidus cystéines dans un état réduit, en réponse aux changements de l'état redox cellulaire. Les groupements thiols sont en effet les cibles de modifications oxydatives capables de modifier l'activité de nombreuses protéines. Au nombre de celles-ci on peut trouver la formation de ponts disulfures, la nitrosylation ou même la glutathionylation, les deux premières options étant réversibles grâce à l'action des thiorédoxines et des glutarédoxines [146, 147].

Lorsqu'elles ne réduisent pas les hydroperoxydes lipidiques, les Trx-R permettent de régénérer une Trx utilisée alors en tant qu'équivalent réducteur dans les processus cellulaires. Elle est également impliquée dans le maintien des niveaux cellulaires d'autres antioxydants comme la Mn-SOD [148].

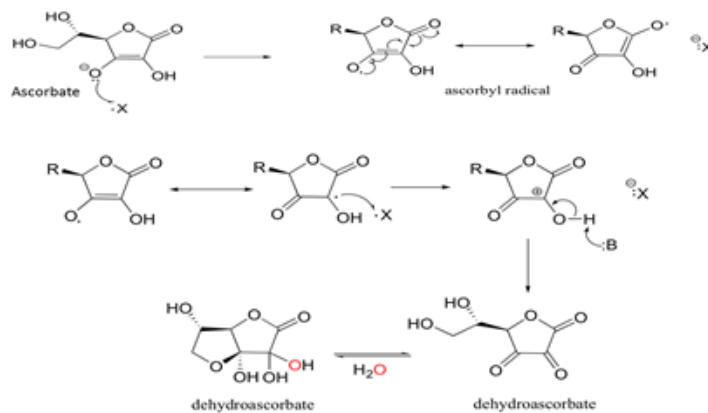


*Figure 8 : Régénération de la thioredoxine*

### 3.2.1.3 L'acide ascorbique

Trivialement dénommé vitamine C lorsqu'il est sous forme lévogyre, c'est une molécule osidique hydrosoluble, qui est un des antioxydants non enzymatiques majoritaires des systèmes intra- et extracellulaires [149, 150].

Il est extrêmement important dans la lutte contre la peroxydation lipidique. Il est en effet impliquée dans un processus de régénération qui va permettre au radical tocophéryl d'être converti en tocophérol à nouveau susceptible de détoxifier les hydroperoxydes lipidiques et prévenir l'oxydation des lipides présents dans les membranes biologiques [86].



*Figure 9 : Oxydation de l'acide ascorbique en acide dehydroascorbique d'après Knafo et al [151]*

Le couple ascorbate/radical ascorbyl possède un faible potentiel redox et la vitamine C peut facilement céder un électron à quasiment tous les radicaux libres (ex :  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$ ,  $\alpha-TO^{\bullet}$ ,  $LOO^{\bullet}$ ). Le radical ascorbyl est peu réactif envers les constituants cellulaires et il réagit avec lui-même pour former les acides ascorbique et déhydroascorbique. L'arrêt de la propagation des réactions radicalaires en chaîne est associé aux capacités de régénération de l'acide ascorbique. Il est intéressant de noter que par sa réactivité vis à vis des métaux de transition, l'ascorbate peut développer une activité pro-oxydante en présence de fer en produisant des radicaux hydroxyles à travers la réaction de Fenton. Par ailleurs, il semble que ce phénomène établi *in vitro* ne soit pas retrouvé *in vivo*, où l'ascorbate protège les molécules biologiques de l'oxydation [152].

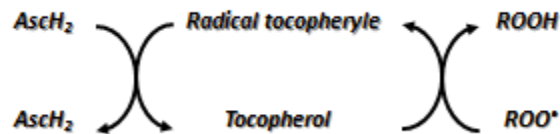


Figure 10 : Système de recyclage des molécules antioxydantes d'après William et al [87]

### 3.2.1.4 Les tocophérols

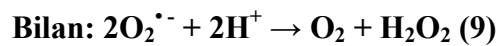
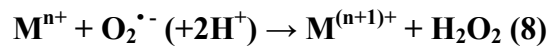
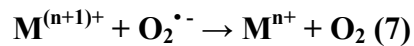
Les tocophérols et les tocotriénols, dénommés également Vitamines E, sont des composés constitués d'un noyau chromanol et d'une longue chaîne aliphatique de 16 carbones qui leur confère un caractère lipophile (elle porte des insaturations dans le cas des tocotriénols). Parmi les 8 formes existantes (4 tocophérols et 4 tocotriénols, chaque classe présentant 4 isomères  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ), l'isomère  $\alpha$  est le plus actif *in vivo* [153]. Les tocophérols agissent en s'incorporant dans les membranes et en protégeant les lipides membranaires. En bloquant les alcoxyles et les alkylperoxyles lipidiques, ils arrêtent la chaîne de propagation [154, 155]; ils se transforment alors en radicaux tocophéryles stables,

qui seront ensuite régénérés par les formes réduites de l'acide ascorbique [156], de l'ubiquinone [157] et du glutathion [158].

## 3.2.2 Les enzymes antioxydantes

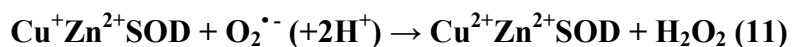
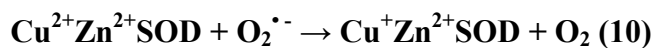
### 3.2.2.1 Les superoxydes dismutases

La famille des *superoxyde dismutase* (SOD) est impliquée dans l'élimination du radical superoxyde. Distribuées de façon ubiquitaire, elles assurent sa dismutation en peroxyde d'hydrogène [159] selon un mécanisme enzymatique de type bi bi ping pong. La fixation du premier substrat permet une modification du site actif de l'enzyme (accompagnée de la libération d'un premier produit), qui pourra ainsi fixer une deuxième molécule de substrat et libérer un second produit de réaction (*réactions 7, 8 et 9*) :



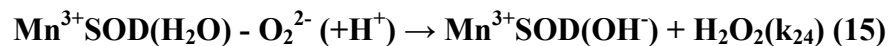
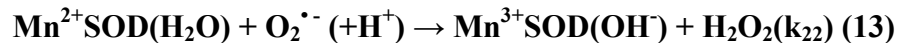
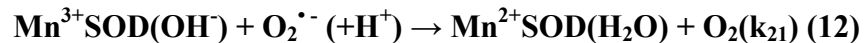
Trois isoformes de SOD ont été caractérisées chez les mammifères : la superoxyde dismutase à cuivre / Zinc (Cu/Zn SOD), à manganèse (Mn SOD) et la SOD extracellulaire (EC SOD).

➤ La Cu/Zn SOD, qui provient de l'expression du gène *sod 1* est localisée dans le cytoplasme, le noyau, les microsomes et dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Une certaine activité est également présente au niveau des lysosomes et des peroxysomes (*réactions 9 et 10*).



L'ion cuivre passe d'un état oxydé à réduit au niveau du site actif de l'enzyme lors des processus catalytiques, alors que l'ion zinc sert à maintenir la stabilité de l'enzyme. C'est l'isoforme de SOD qui possède la plus grande constante de vitesse catalytique, avec une  $K_{cat}$  de  $2 \times 10^9 M^{-1} \cdot sec^{-1}$  [160, 161].

➤ La Mn SOD est une enzyme codée par le gène *sod 2* et se trouve dans la mitochondrie. La dismutation réalisée par cette protéine diffère de celles des autres SOD puisque deux mécanismes sont en compétition pour la détoxification des superoxydes. En plus de celui que l'on trouve dans la Cu/Zn SOD (*réactions 11 et 12*), il se forme un complexe enzyme/eau/superoxyde appelé complexe inhibiteur qui permet de ralentir la vitesse de catalyse (*réactions 13 et 14*). Il a été démontré qu'en augmentant la constante  $k_{24}$  (*réaction 14*), comme dans les SOD bactériennes, les conséquences *in vivo* tendent vers un effet antiprolifératif [162].



Si la Cu/Zn SOD est la plus efficace, la Mn SOD est absolument indispensable à la survie cellulaire. L'ADN mitochondrial est en effet particulièrement sensible du fait de l'exposition au métabolisme de l'oxygène, d'un système de réparation inefficace et d'un manque d'histones. Des souris invalidées pour le gène de la *sod 2* ne peuvent survivre que quelques jours contrairement à celles pour les gènes de la *sod 1* ou de la *sod 3* [163, 164].

➤ La EC SOD est la dernière SOD à avoir été caractérisée. C'est une glycoprotéine hydrophobe Cu/Zn codée par le gène *sod 3* qui se présente sous la forme

d'un homotétramère [165] et localisée sur la face externe des cellules. Elle a la particularité d'avoir une partie C terminale fortement chargée positivement qui lui permet de se fixer sur les glycosaminoglycanes et d'empêcher leur dégradation par des molécules oxydantes [166]. Sa principale fonction serait de prévenir l'interaction de  $O_2^{\bullet-}$  avec  $NO^{\bullet}$  au niveau des cellules endothéliales [167].

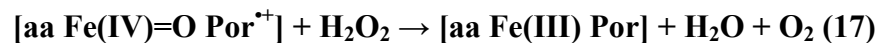
### 3.2.2.2 La catalase

La catalase est une protéine ubiquitaire, composée de 4 chaînes polypeptidiques, chacune contenant une structure porphyrinique avec un atome de fer sous forme ferrique. La catalase et les enzymes présentant une activité catalasique permettent de détoxifier la cellule en décomposant le  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et en  $O_2$ . Le mécanisme se fait par réaction entre le fer et le peroxyde d'hydrogène selon la séquence suivante :

✓ La liaison 'O-O' est clivée de façon hétérolytique, ce qui génère une molécule d'eau et un 'oxène' fortement oxydant et instable. Celui-ci (composé I) correspond à un radical oxoferryl 'Fe IV=O' associé à une porphyrine radicalaire et cationique (*réaction 16*).



✓ Le composé I utilise ensuite une seconde molécule d' $H_2O_2$  comme réducteur pour permettre le retour à une forme porphyrine ferrique (*réaction 17*).



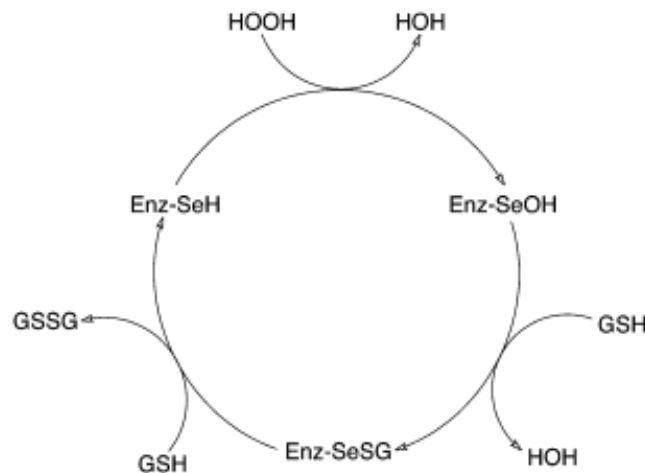
Présente dans un grand nombre de tissus en particulier le foie et les érythrocytes, la catalase est essentiellement localisée au niveau des peroxysomes [148]. Dans le cadre d'une surproduction d'ERO, elle agit en synergie avec les SOD [148].



### 3.2.2.3 Les glutathion peroxydases et réductases

Les **glutathion peroxydases (GPx)** sont des protéines qui catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes organiques tels que le cholesteryl hydroperoxyde ou les peroxydes lipidiques en alcools. Comme pour les SOD, la réaction est de type bi bi ping pong et comprend deux évènements indépendants :

- L'étape d'oxydation : le résidu sélénocystéine du site actif de l'enzyme est oxydé par un peroxyde.
- L'étape de réduction : une première molécule de GSH intervient comme cofacteur dans le but de réduire à nouveau le résidu sélénocystéine et de libérer une molécule d'eau. Une deuxième molécule de GSH servira à régénérer la forme réduite de départ, tout en libérant une molécule de GSSG.



*Figure 11 : Fonctionnement enzymatique bi bi ping pong des GPx d'après Heverly-Coulson [168]*

Il existe plusieurs types distincts de GPx chez les mammifères; elles diffèrent par leurs substrats, leur rôle et leur localisation. Les principales sont des sélénoprotéines (GPx 1, 2, 3 et 4) contenant un acide aminé rare, la sélénocystéine; dans les autres isoformes celui-ci est remplacé par un résidu cystéine, ce qui généralement provoque une forte chute de l'activité spécifique.

- La GPx 1 est l'isoforme qui a été la plus étudiée. Elle possède une localisation intracytoplasmique dans la plupart des cellules et notamment au niveau des cellules gliales [169].
- La GPx 2 est davantage associée à une fonction de métabolisation des peroxydes organiques ingérés, expliquant sa localisation particulière dans le tractus gastrointestinal [170-172].
- La GPx 3 est une glycoprotéine excrétée dans le plasma et les fluides extracellulaires, assurant une fonction de protection des membranes cellulaires. Elle est majoritairement synthétisée dans le foie, le cœur, le poumon [173-175], et dans le rein où elle pourrait assurer un rôle de protection des tubules proximaux [176].
- La GPx 4 est associée à la métabolisation des peroxydes phospholipidiques. Elle est localisée d'une part dans le cytosol et d'autre part au niveau des membranes mitochondriales et des noyaux de la plupart des cellules [177, 178]. Trois formes sont synthétisées à partir du même gène, une forme cytosolique, une forme mitochondriale et une nucléaire [179]. Elle joue également un rôle structural sous forme de sperm nucleus GPx, au niveau des spermatides.
- Certaines protéines autres que les GPx possèdent également une activité peroxydasique. Ce sont le plus souvent des protéines selenium indépendante, ce qui explique que l'activité peroxydasique reste limitée.

Pour que la réduction des peroxydes puisse se faire, il faut que la molécule de GSSG soit régénérée. Ceci se fait par l'action de **la glutathion réductase** en utilisant le NADPH comme cofacteur.

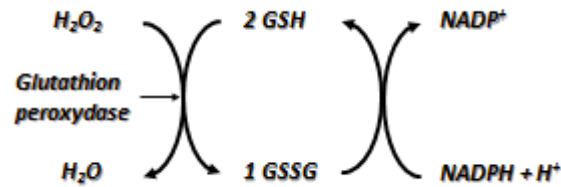


Figure 12 : Mode d'action des GPx d'après Bacot et al [180]

#### 3.2.2.4 Les glutathion-S-transférases

Les glutathion-S-transférases (GSTs) sont des enzymes qui protègent la cellule des molécules toxiques par S-conjugaison avec le GSH. S'en suit une déprotonation de la fonction thiol qui la rend extrêmement nucléophile et prête à réagir avec tous les potentiels électrophiles (ex : carbone électrophile, atome de soufre) [181]. Il existe trois formes de GSTs; les deux premières comprennent des enzymes solubles cytosoliques et mitochondriales, alors que la dernière regroupe des GSTs microsomales connues également sous le nom de MAPEG (*membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione*).

Plusieurs fonctions sont attribuables aux GST :

- La première participe à la détoxification des xénobiotiques. La conjugaison avec le glutathion catalysée par les GSTs est la première de quatre étapes conduisant à la formation des mercapturates, les métabolites finaux excrétés dans les urines [182].
- Les GSTs sont impliquées dans la détoxification des produits du stress oxydant. De par leur activité peroxydase sélénium indépendante, elles sont capables de réduire les cholesteryl et hydroperoxydes lipidiques [183]. Mais l'activité principale réside dans la conjugaison du glutathion avec les carbonyles  $\alpha,\beta$  insaturés dont la taille est comprise entre 6 et 15 carbones, les o-quinones et les dérivés nucléotidiques oxydés. C'est l'isoforme  $\alpha$  4-4 cytosolique qui est impliquée dans la détoxification du 4-HNE [184].

- L'une des étapes de la dégradation des acides aminés aromatiques fait intervenir les GSTs, en particulier la classe Zeta [185].
- La classe  $\alpha$ GST favorise l'isomérisation des 3-keto-steroids dans la voie de synthèse des stéroïdes [186].
- Les GSTs contribuent à la biosynthèse de certains eicosanoïdes [187].

### 3.2.2.5 Les aldocétose réductases et aldéhyde deshydrogénases

➤ **L'aldocétose réductase (AR)** est une enzyme ubiquitaire monomérique dépendante du NADPH qui catalyse la réduction du glucose en sorbitol. De localisation cytoplasmique et nucléaire, elle est particulièrement abondante dans les tissus endocriniens [188], le placenta [189] et la rétine [190]. Elle catalyse également la réduction d'une grande variété d'aldéhydes saturés et insaturés. Il a été démontré *in vitro* que cette réaction était  $10^3$  à  $10^4$  fois plus efficace que la réduction du glucose [191]. L'AR peut également réduire les adduits glutathion-aldéhyde avec une meilleure efficacité que l'aldéhyde seul. Dans les deux cas, elle permet de réduire la fonction aldéhyde libre potentiellement réactive, même après glutathionylation [191].

➤ **L'aldéhyde deshydrogénase (ALDH)** est une enzyme dépendante du NADH, capable d'oxyder les aldéhydes en leurs acides carboxyliques correspondant. De localisation nucléaire et cytoplasmique, elle n'est exprimée que dans peu de tissus, essentiellement dans le foie, le pancréas, les poumons et l'estomac. Les formes les plus importantes sont les ALDH 1, cytosolique et ALDH 2, mitochondriale. Elles permettent donc également l'inactivation de la fonction aldéhyde [192].

## 3.3 Stress oxydant et nitrosant

Le stress oxydant se manifeste lorsque les capacités antioxydantes de l'organisme sont dépassées par une production excessive de radicaux libres [193]. Il serait plus juste de

dire que tout processus qui conduit la cellule vers un état oxydé pourrait être qualifié de stress oxydant, les radicaux libres n'étant pas les seules molécules oxydantes dans l'organisme.

### 3.3.1 Potentiel redox cellulaire

De faibles quantités de radicaux libres sont présentes dans la cellule. Les concentrations basales d'ERO et ERA sont déterminées par l'équilibre entre leur production et leur détoxification par des systèmes antioxydants. Chaque cellule est caractérisée par une certaine concentration d'électrons, dont le flux est pris en charge par plusieurs couples Ox/Red (ensemble formé par un oxydant et un réducteur qui se correspondent dans la même demi-équation redox). A partir de là, l'environnement redox, ou redox cellulaire, est défini comme le reflet de l'état d'oxydo-réduction de l'ensemble de ces couples Ox/Red de la cellule.

Schafer et Buettner ont défini l'environnement redox comme la somme des produits entre le potentiel de réduction et la capacité réductrice (concentration) de chaque couple redox présent dans les fluides biologiques, les organelles, les cellules ou les tissus [139]. Son expression mathématique est représentée par l'équation de Nernst. Décrite pour la première fois par Walter Nernst en 1889 (*Reasoning of theoretical chemistry: Nine papers, 1889*), cette équation permet de calculer le voltage électrochimique d'une cellule en tenant compte de la variation d'énergie de Gibbs et de la loi d'action de masse :

$$\Delta E = \Delta E^\circ - (RT/nF)\ln Q \quad (17), \quad \text{avec } Q = [\text{Ox}_1]^c [\text{Red}_2]^d / [\text{Red}_1]^a [\text{Ox}_2]^b \quad (18)$$

Dans laquelle  $\Delta E$  : Potentiel redox

R : Constante des gaz parfait

T : Température en Kelvin

n : Nombre d'électrons impliqué

F : Constante de Faraday

Le terme  $(RT/nF) \cdot \ln Q$  représente un facteur correctif : il permet de tenir compte de la nature de la molécule ( $n$ ) et de sa concentration de part et d'autre de la membrane; elles ne sont en effet pas équivalentes, la loi de Fick (loi de diffusion prévoyant à terme un équilibre quantitatif de chaque côté d'une membrane pour une espèce donnée) n'est pas respectée du fait des protéines assurant des fonctions de pompes.

$Q$  est l'expression de la loi d'action de masse représentée par la formule  $a\text{Red}_1 + b\text{Ox}_2 \leftrightarrow c\text{Ox}_1 + d\text{Red}_2$ , donnée par la règle du gamma permettant de prévoir la réaction entre 2 couples  $\text{Ox}_1/\text{Red}_1$  et  $\text{Ox}_2/\text{Red}_2$  (les coefficients  $a$ ,  $b$ ,  $c$  et  $d$  équilibrant la réaction).

L'environnement redox diffère selon les compartiments cellulaires, ce qui a plusieurs conséquences sur le fonctionnement de la cellule [139] : le redox physiologique est préférentiellement réduit dans la mitochondrie, le noyau et le cytosol alors qu'il est plus oxydé dans le réticulum endoplasmique pour favoriser la formation des ponts disulfures indispensables au bon repliement des structures tertiaires et quaternaires des protéines. De plus, il a été montré qu'un redox plus réduit conduit vers une différenciation et une prolifération cellulaire [194, 195] alors qu'un environnement plus oxydé engendré par des molécules pro-oxydantes, va initier davantage des processus allant vers la mort cellulaire [86]. Ceci rejoint d'ailleurs les travaux mettant en évidence le rôle pro-apoptotique des hydroxy-alkenals, 4-HNE et 4-HHE, susceptibles de provoquer une déplétion du glutathion réduit et d'induire l'apoptose; la consommation du pool de glutathion par le 4-HNE provoquait l'activation d'une kinase pro-apoptotique c-JUN Nterminale (JNK) [121, 196, 197]. Le cycle cellulaire est lui-même contrôlé en partie par l'état redox, comme l'indique de récents résultats montrant une fluctuation des niveaux de glutathion réduit intracellulaires durant les différentes phases du cycle [195, 198].

Une variation des concentrations des couples Ox/Red impliqués dans le redox cellulaire n'implique pas nécessairement une modification du potentiel redox. En effet, certaines composantes du système de défense antioxydante ont un poids majeur dans le maintien de l'homéostasie redox, d'autres étant sans pouvoir significatif; les plus

importantes sont le glutathion et les thioredoxines. Le premier étant le plus abondant dans la cellule, le calcul de son redox permet d'avoir une bonne estimation du redox cellulaire [139].

### 3.3.2 Métabolites d'oxydation de la nutrition parentérale

Les espèces radicalaires sont capables d'initier et de propager des réactions radicalaires sur d'autres composés. Les molécules néoformées présentent généralement la particularité d'être plus stables et d'avoir une demi-vie beaucoup plus longue (ex : environ 20 min pour des F<sub>2α</sub>-isoprostanes [199] vs 10<sup>-9</sup> sec pour le radical hydroxyle [109]). Le peroxyde d'hydrogène et les 4-hydroxy-alkénals font partie de celles-ci. Dans le cadre de notre projet, notre intérêt pour ces molécules vient d'une part du fait qu'elles sont générées dans les solutions de nutrition parentérale après photoexcitation de la Rb et d'autre part, qu'elles sont alors infusées aux prématurés qui ont un système de défense immature.

#### 3.3.2.1 Le peroxyde d'hydrogène

##### 3.3.2.1.1 Généralités

Souvent classée parmi les espèces réactives de l'oxygène, c'est une molécule particulière qui n'est à pas à proprement parlé une espèce radicalaire. Ceci lui confère une capacité à traverser les membranes cellulaires et provoquer des dommages loin de son site de production [200].

##### 3.3.2.1.2 Formation

Le peroxyde d'hydrogène est spontanément généré dans les microsomes, les peroxysomes et les mitochondries par réaction de dismutation (*réaction 19*):



### 3.3.2.1.3 Structure et réactivité

Il est composé de 2 atomes d'oxygène lié par une liaison simple. Chaque oxygène porte un atome d'hydrogène : la molécule adopte alors une structure non planaire dont l'axe de symétrie est la liaison 'O-O'. Les hydrogènes sont en configuration vicinale et stabilisent la structure par appariement des orbitales p de l'oxygène avec les orbitales de la liaison 'O-H'. Cet appariement confère une certaine rigidité à la molécule dont la rotation autour de l'axe 'O-O' devient défavorisée sur le plan énergétique.

Chimiquement parlant, c'est une molécule faiblement réactive. Elle peut jouer à la fois le rôle de réducteur ou d'oxydant doux ( $E_0 \text{ H}_2\text{O}_2 / \text{H}_2\text{O} = 1,8 \text{ V}$ ) mais n'est pas capable seule d'oxyder un grand nombre de biomolécules (du fait d'une haute énergie d'activation). De ce fait, elle réagit quasiment exclusivement avec la fonction thiolate [201-205] et la vitesse de réaction est faible par rapport à celle des systèmes enzymatiques des glutathion peroxydases et catalases (à titre de comparaison entre constantes de vitesse d'ordre 2,  $k_{\text{GSH}} = 0,87 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  vs  $k_{\text{GPX}} = 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  [206]).

### 3.3.2.1.4 Cibles biochimiques du peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène réagit avec les thiols pour produire dans un premier temps un acide sulfénique, selon la *réaction 20* :



En présence d'un excès de thiols, il peut rapidement se former un disulfide provenant de la réaction entre une molécule d'acide sulfénique formée et un deuxième thiol (*réaction 21*):





Les principales cibles physiologiques du peroxyde d'hydrogène *in vivo* sont donc les protéines ou peptides contenant des acides aminés soufrés (cystéine, méthionine), d'autant plus lorsque les thiols sont ionisés.

#### 3.3.2.1.5 *Impact du peroxyde d'hydrogène sur la signalisation cellulaire*

Le peroxyde d'hydrogène participe à la signalisation cellulaire. Il est en effet produit en conditions physiologiques, des expériences sur le foie de rat ayant montré une production mesurée à 90 nmol/min/g de tissu humide. Il a été démontré [207, 208] qu'il interagit avec :

- Les récepteurs de croissance PDGF et EGF
- Les pompes calciques du réticulum endoplasmique
- c-Jun N-terminal Kinase *via* le Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  et l'interleukine 1
- Les protéines tyrosine phosphatases
- Les Mitogen-Activated Protein kinases (MAP kinases)

### 3.3.2.2 Le *trans*-4-hydroxy-2-nonenal

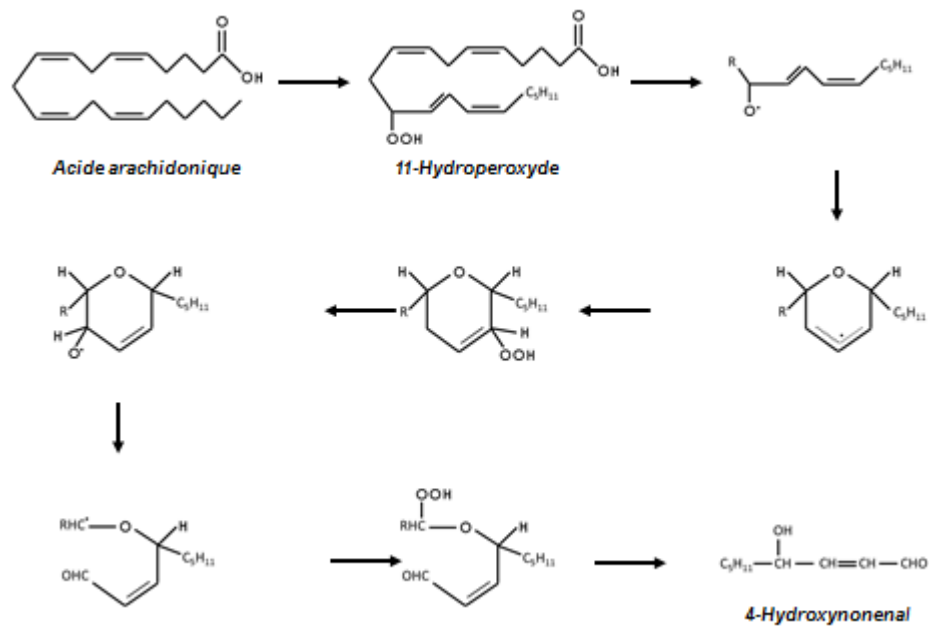
#### 3.3.2.2.1 Généralités

Découvert en 1967 par Schauenstein [209], avant que le mécanisme de formation dans différents systèmes biologiques ne soit élucidé par Esterbauer en 1991 [16], le 4-HNE est une biomolécule de la famille des hydroxy-alkenals provenant de la dégradation d'hydroperoxydes lipidiques. Beaucoup plus stable que de nombreuses espèces réactives de l'oxygène dont la durée de demi-vie n'excède pas la seconde, il agit comme « second messenger » capable de traverser les membranes et gagner d'autres compartiments cellulaires, amplifiant les dommages engendrés par les diverses composantes du stress oxydant. C'est quantitativement à ce jour, l'aldéhyde lipidique le plus abondamment produit, que l'on retrouve à des concentrations variant entre 0,069 et 0,107  $\mu\text{M}$  dans le plasma humain [210].

#### 3.3.2.2.2 Formation

Pryor et Porter ont décrit en 1990 [17] deux types de réactions non enzymatiques complexes, aussi fréquentes l'une que l'autre, pouvant conduire à la formation de 4-HNE à partir d'acides gras polyinsaturés n-6 et plus particulièrement d'acide arachidonique (Figure 13) :

- L'attaque radicalaire de l'acide arachidonique entraîne une perte d'hydrogène bis-allylique du carbone 11, qui va conduire avec l'oxygène dissout à la formation d'un acide 11-hydroperoxyarachidonique. En présence de métaux de transition comme le  $\text{Fe}^{2+}$ , celui-ci devient un radical alcoyle qui se cyclise de façon transitoire (stabilisé par résonance). Après une nouvelle oxydation et en présence de métaux de transition, le cycle s'ouvre et conduit à la formation de 4-HNE après déshydratation interne et fragmentation successive.



**Figure 13 : Formation du 4-HNE à partir de l'acide 11- hydroperoxyarachidonique d'après Pryor et al [17]**

- La deuxième réaction repose sur le même principe mais démarre par une perte d'hydrogène bis-allylique du carbone 15 formant un acide 15-hydroperoxyarachidonique. Il n'y a pas de cyclisation dans ce cas mais la formation d'un epoxy qui, après oxydation et en présence de métaux de transition, formera le 4-HNE.

### 3.3.2.2.3 Structure et réactivité

Le *trans*-4-hydroxy-2-nonenal est une molécule, comme son nom l'indique à 9 carbones ( $156 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) présentant un caractère amphiphile, à la fois miscible dans l'eau et soluble dans les phases lipidiques hydrophobes. Ses propriétés lipophiles sont toutefois plus exprimées. La conséquence première de cette propriété est sa faculté à se concentrer dans les membranes biologiques, réagissant ainsi avec les phospholipides et les protéines [119, 211].

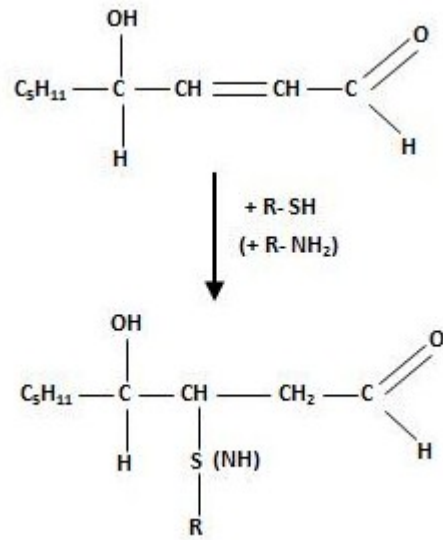
Sa structure comporte 3 groupes fonctionnels qui expliquent sa grande réactivité; un hydroxyle en position 4 et une double liaison conjuguée à une fonction carbonyle sur le carbone 1. Les 2 doublets non liants de l'oxygène de la fonction carbonyle induisent un effet mésomère attracteur – II, qui du fait de la conjugaison avec la double liaison, appauvrit le carbone 3 en électrons et lui confère une charge positive partielle. Ce phénomène est d'ailleurs encore accentué par effet mésomère de la fonction hydroxyle. Sa réactivité face aux nucléophiles passe donc d'abord par le carbone 3 et dans un second temps, par la fonction aldéhyde.

Le carbone 4 du 4-HNE est asymétrique, rendant la molécule chirale. L'énantiométrie (R) et (S) présente des propriétés biologiques intéressantes, puisque selon l'espèce, sa métabolisation est énantiosélective [212].

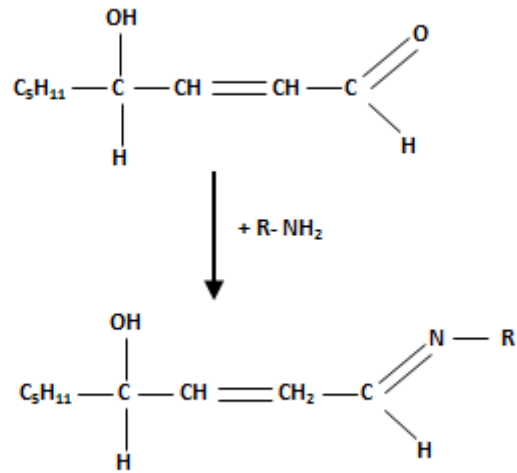
#### 3.3.2.2.4 Cibles biochimiques du 4-HNE

De par ses 3 fonctions agissant de façon synergique, le *trans*-4-hydroxy-2-nonal réagit avec l'ensemble des molécules contenant des groupements nucléophiles amine primaire ou thiols. Le mécanisme réactionnel le plus fréquent est l'addition de Michael qui consiste en la formation d'un lien covalent entre le carbone 3 du 4-HNE et le groupement nucléophile de la molécule cible. L'adduit ainsi généré peut rester tel quel ou dans certains cas, se cycliser par déshydratation interne en un hémiacétal relativement stable, comme pour l'adduit glutathion-HNE.

Une autre possibilité réside dans la réaction entre l'aldéhyde du 4-HNE et un groupement amine primaire de la molécule cible, avec pour résultat la formation d'une base de Schiff. La réaction est toutefois moins favorisée énergétiquement que l'addition de Michael [119]. Uchida *et al* ont d'ailleurs montré en 1993 [213] que les adduits de Michael sont très largement majoritaires en conditions physiologiques.



*Figure 14 : Réactivité du 4-HNE avec formation d'un adduit de Michael*



*Figure 15: Réactivité du 4-HNE avec formation d'une base de Schiff*

### 3.3.2.2.5 Réactions avec les peptides et les protéines

Les peptides et les protéines sont quantitativement les groupes les plus affectés par le 4-HNE. Jusqu'à 8% des molécules formées dans la cellule modifie le pool protéique cellulaire [214].

Dans la plupart des cas, la formation d'adduit altère la structure de la molécule originale, induisant une perte partielle voire totale de fonction. Toutes les cibles du 4-HNE *in vitro* et *in vivo* ne seront pas listées ici; elles sont remarquablement référencées dans la revue de Poli *et al* de 2007 [119]. Toutefois, il est à noter que l'utilisation de composés polyaminoacides synthétiques a permis de mettre en évidence une réactivité spécifique pour les résidus cystéine, histidine et lysine (cys >> lys > his). Toutefois, même si la réactivité de la cystéine est la plus forte, l'adduit formé est le moins stable. Paradoxalement, la liaison avec l'histidine est la plus stable, cet acide aminé étant moins bon électrofuge que les thiols ou les amines primaires [215]. Du fait de sa grande réactivité, la cystéine est la cible préférentielle du 4-HNE en conditions physiologiques. Lorsque les niveaux cellulaires d'aldéhyde augmentent, la réaction avec les résidus histidine et lysine devient possible; elle induit la formation d'adduits plus stables, à durée de vie plus longue.

L'addition de 4-HNE ne se fait pas toujours de façon stœchiométrique dans un ratio 1:1. Des modifications plus complexes peuvent aussi se produire lorsque la molécule utilise à la fois sa fonction aldéhyde et l'insaturation du carbone 3. Cela peut générer des liaisons intra- et intermoléculaires entre une ou plusieurs protéines et donner lieu à de véritables ponts inter-protéiques mêlant base de Schiff et adduit de Michael [216].

### 3.3.2.2.6 Réactions avec les lipides

Le 4-HNE peut former des liaisons par addition de Michael et base de Schiff avec les phosphatidyléthanolamines et à un degré moindre, avec les phosphatidylsérines [217]. Dans le cas des plasmalogènes, la conséquence est une dégradation en position sn1 avec perte de leurs propriétés antioxydantes [180].

### 3.3.2.2.7 Réactions avec les cofacteurs

L'un des composants de la vitamine B6, le pyridoxamine, est également une cible du 4-HNE [218]. Il a été montré que sa fonction amine pouvait réagir avec l'aldéhyde plus rapidement que la fonction amine de la N-acetyl lysine [218].

L'ascorbylation du *trans*-4-hydroxy-2-nonenal est également possible par formation d'un adduit de Michael avec la vitamine C. Ce complexe est détectable en concentration  $\mu\text{M}$  dans le plasma de sujets normaux ( $55 \pm 15 \mu\text{M}$  d'acide ascorbique plasmatique) [219].

### 3.3.2.2.8 Réactions avec les acides nucléiques

Les quatre désoxynucleosides de l'ADN peuvent réagir avec le 4-HNE [220], même si la désoxyguanosine est la cible préférentielle. Deux types de réactions peuvent exister.

Le premier mécanisme fait intervenir un adduit de Michael formé entre l'amine primaire de la désoxyguanosine et le carbone 3 de l'aldéhyde portant l'insaturation. S'en suit une cyclisation après déshydratation interne [221]. Quatre stéréoisomères peuvent potentiellement être formés, tous ayant été montrés mutagéniques. Le degré de mutagénicité est d'ailleurs déterminé par la stéréochimie de ces adduits. À une échelle plus importante, le 4-HNE est susceptible comme pour les protéines, de créer des modifications plus complexes par pontage inter-ADN [222].

Un second mécanisme moins fréquent fait appel à une forme oxydée du 4-HNE, le 2,3-époxyde-4-hydroxynonenal qui va produire un adduit de Michael avec l'amine primaire de la désoxyguanosine, le 1,N-éthénodesoxyguanosine [223].

### 3.3.2.2.9 Élimination du 4-HNE, intermédiaires et réactions enzymatiques

En situation de stress oxydant, les concentrations de 4-HNE augmentent significativement (0,03 vs 0,3-4,5 nmol/mg protéines dans les microsomes de foie de rat après traitement au tétrachlorométhane,  $\text{CCl}_4$ ) [224], mettant en évidence l'importance de

l'efficacité des mécanismes de détoxification. Ceux-ci ont été étudiés par des méthodes de cinétique utilisant le plus souvent la molécule marquée au tritium, le [<sup>3</sup>H]4-HNE. De nombreux métabolites primaires et secondaires ont ainsi pu être identifiés [225, 226].

#### 3.3.2.2.10 Vitesse d'élimination

Les premières études métaboliques ont déterminé la vitesse d'élimination et de métabolisation du 4-HNE dans l'intestin du rat après un épisode d'ischémie-reperfusion. Il a été montré dans ce modèle que son accumulation tissulaire est limitée [225] et la plus haute concentration mesurée ne dépasse pas 6,5 µM [226], pour une vitesse d'élimination calculée de 22 nmol/g de poids humide/min [226]. Cependant, celle-ci varie d'un tissu à l'autre : à titre de comparaison, elle a été mesurée à 50 nmol/g de poids humide/min dans le cœur perfusé de rat [227] et à 160-190 nmol/g de poids humide/min dans un rein perfusé du même animal [228].

#### 3.3.2.2.11 Intermédiaire primaires

Le *trans*-4-hydroxy-2-nonenal ne s'accumule pas en raison de son métabolisme qui met en jeu plusieurs voies d'élimination, conduisant à sa biotransformation en métabolites catabolisés par l'organisme ou simplement excrétés dans les urines.

Les principales voies métaboliques du 4-HNE vont conduire à la formation de 3 métabolites primaires : le 1,4-dihydroxynonène (DHN), l'acide-4-hydroxy-nonénoïque (HNA) et l'adduit *trans*-4-hydroxy-2-nonenal-glutathion (4-HNE-SG) [16]. Les travaux d'Esterbauer *et al* en 1985 [229], suivi de ceux de Siems *et al* en 1997 [230] ont permis de mettre en évidence les systèmes enzymatiques impliqués ainsi que la proportion des métabolites formés :

➤ Le DHN est le produit de réduction par les alcool deshydrogénases [231]. Cette enzyme dépendante du NADH est essentiellement localisée dans le cytosol des hépatocytes. Les aldocétose réductases peuvent également réduire le 4-HNE. De



localisation davantage extrahépatique et avec une forte affinité pour leur substrat, les aldoses réductases représentent la voie de détoxification majeure des aldéhydes dans la rétine [232].

➤ Le HNA est le produit d'oxydation par les aldehyde deshydrogénases [233], dont les différentes isoenzymes sont cytosoliques, mitochondriales et microsomales [234].

➤ Le 4-HNE-SG est le produit de conjugaison du 4-HNE avec le glutathion sous l'action des glutathion-S-transférases [235], enzymes ubiquitaires mais particulièrement abondantes dans les hépatocytes [229, 233, 235]. Au même titre que la liaison avec le GSH, le 4-HNE peut de la même façon être conjugué avec la cystéine [119] et la carnosine [236]. Elles permettent d'accélérer entre 300 et 600 fois la réaction [16].

La vitesse de formation de ces intermédiaires n'est pas identique. De plus elle varie en fonction du tissu, l'équipement enzymatique étant différent. La réduction du DHN est clairement un processus minoritaire alors que la liaison avec le glutathion est prédominante: il a été établi après 2 min d'incubation d'une suspension d'hépatocytes de rat avec 100  $\mu\text{M}$  de HNE que la proportion de 4-HNE-SG, HNA et DHN était de 6 : 4 : 1 [229, 230].

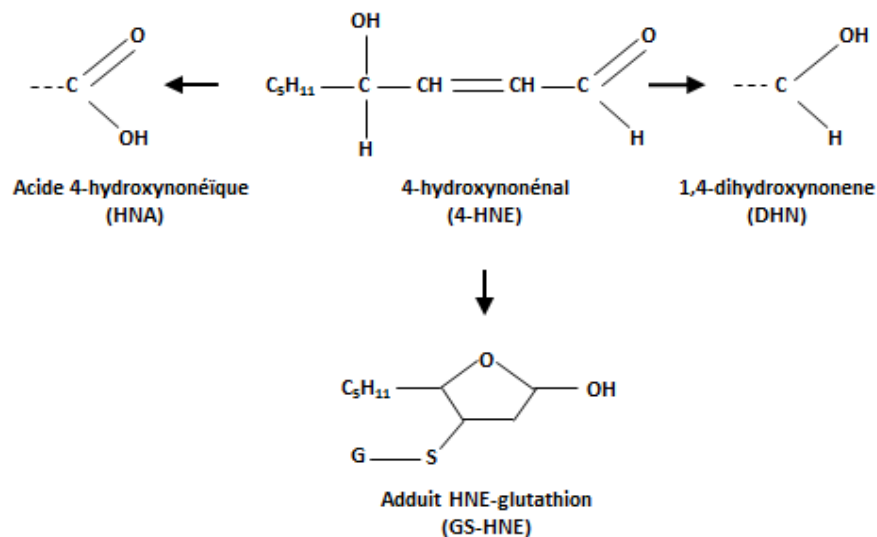


Figure 16: Principales voies métaboliques du-HNE d'après Alary et al [237]

### 3.3.2.2.12 Intermédiaires secondaires

Un cas particulier est à signaler, même s'il ne s'apparente pas à une voie de métabolisation propre du *trans*-4-hydroxy-2-nonenal. Il s'agit de la dégradation des adduits HNE-protéines, plus sensibles à la protéolyse que les protéines initiales [238]. Leur dégradation est accélérée dans l'unité 26S du protéasome, comme le montre l'étude de Carbone *et al* [238]. Une expérience menée sur l'alcool deshydrogénase traitée par le 4-HNE met en évidence une élimination par les systèmes de lyse de réticulocytes de lapin 1,5 fois plus rapide que celle de la protéine native [238]. Le fonctionnement de cette voie est toutefois conditionné par le niveau cellulaire de 4-HNE. De faibles niveaux *in vivo* augmentent effectivement la susceptibilité des protéines modifiées à la protéolyse [214]. Cependant, l'augmentation de celui-ci peut entraîner une fixation au protéasome lui-même. Et à ce moment, la formation d'adduits empêche alors les sous-unités 19S et 20S de s'associer et de ce fait diminue fortement l'activité proteasomale [239].

Alary *et al* [237, 240, 241] ont montré que la majorité des intermédiaires secondaires retrouvés dans les urines, est conjuguée à l'acide mercapturique. Ils sont issus des réactions suivantes :

- La conjugaison du 4-HNE et de ses intermédiaires primaires, HNA et DHN, au glutathion pour former des adduits 4-HNE-SG, HNA-SG et DHN-SG. La formation de DHN-SG est également possible par réduction de l'adduit HNE-SG par les aldocétose réductases [237]. Ces 3 composés sont exportés du foie vers le rein, avec élimination de l'acide glutamique et de la glycine du glutathion. Les composés cystéinyles formés sont acétylés pour former des conjugués avec l'acide mercapturique, alors excrétés dans les urines [225, 240].
- Le HNA et le DHN peuvent subir une  $\omega$ -hydroxylation aboutissant au 9-OH-HNA et 9-OH-DHN. Après conjugaison avec le glutathion, ces composés seront également convertis en conjugués de l'acide mercapturique.

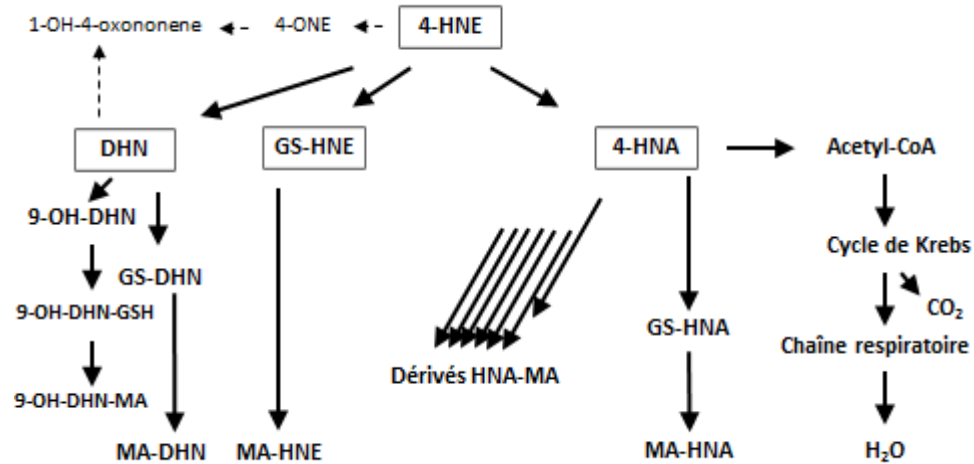


Figure 17 : Métabolites secondaires du 4-HNE d'après Guéraud et al [212].

Le HNA peut également être réutilisé dans le métabolisme énergétique; sa  $\beta$ -oxydation génère des acides tricarboxyliques tels que le citrate, le fumarate ou encore le malate [242]. De l'acétyl-CoA, du dioxyde de carbone et de l'eau métabolique sont également produits en fin de réaction [230].

La réduction du 4-HNE et de l'adduit 4-HNE-SG peut être réalisée par les aldoses réductases, de localisation plutôt extrahépatique; elles ont une plus grande affinité pour l'aldéhyde que pour l'adduit. Elles représentent d'ailleurs la voie de détoxification majeure des aldéhydes dans la rétine [232].

### 3.3.2.2.13 Métabolisme du 4-HNE

En dehors des voies d'élimination présentées ci-dessus, le 4-HNE présente la particularité de pouvoir être métabolisé en un hydroxy-acide, le 4-hydroxynonanoate. Cette molécule va par la suite être métabolisée par deux voies parallèles [243]. Au cours de la première, majoritaire, elle va subir une phosphorylation de la fonction hydroxyl en C4, suivie d'une isomérisation aboutissant à un composé hydroxylé en C3. Cette nouvelle molécule, qui est un 3-hydroxy-4-P-acyl-CoA, va alors subir une oxydation complète de son squelette carboné par plusieurs  $\beta$ -oxydation successives. La deuxième voie met en jeu

quant à elle une  $\beta$ -oxydation du 4-hydroxynonanoate, suivie d'une  $\alpha$ -oxydation pour ensuite se terminer par deux nouvelles  $\beta$ -oxydations. Dans les deux cas, elles se terminent par la métabolisation du 4-hydroxynonanoate en acétyl-CoA, propionyl-CoA et en formate [243].

#### *3.3.2.2.14 Impact du 4-HNE sur la signalisation cellulaire*

Comme dit précédemment, le 4-HNE peut par sa réactivité modifier chimiquement des protéines à caractère nucléophile. Ceci explique la modulation que peut exercer cette molécule sur les enzymes et les protéines impliquées dans des voies de transduction de signalisation cellulaire. Cependant les effets sont variables, en fonction des capacités de détoxification du type cellulaire et en fonction de la concentration de 4-HNE.

Brièvement, il est capable d'interagir avec :

- Les récepteurs tyrosine kinases (RTk). En se liant à ces dernières, il provoque leur autophosphorylation, activant ainsi plusieurs voies de signalisation. Un effet biphasique a été montré. De faibles de concentrations de 4-HNE (0,1 à 1  $\mu$ M) induisent l'autophosphorylation des enzymes et activent ainsi la voie de signalisation PI3K/Akt, ce qui conduit à une réponse mitogénique sur les cellules musculaires lisses [244]. Lorsque les niveaux augmentent 2 fois plus, cela se traduit par un arrêt du cycle cellulaire et un processus d'apoptose dans des cellules neuronales [245]. Cet aspect biphasique se retrouve également au niveau de l'influence sur l'expression génique (voir paragraphe 3.3.2.2.15).

- Les récepteurs D1-like Dopamine. Son interaction entraîne une diminution d'activité des adénylate cyclases à récepteur dopaminergique et donc une baisse de la production d'AMP cyclique [246].

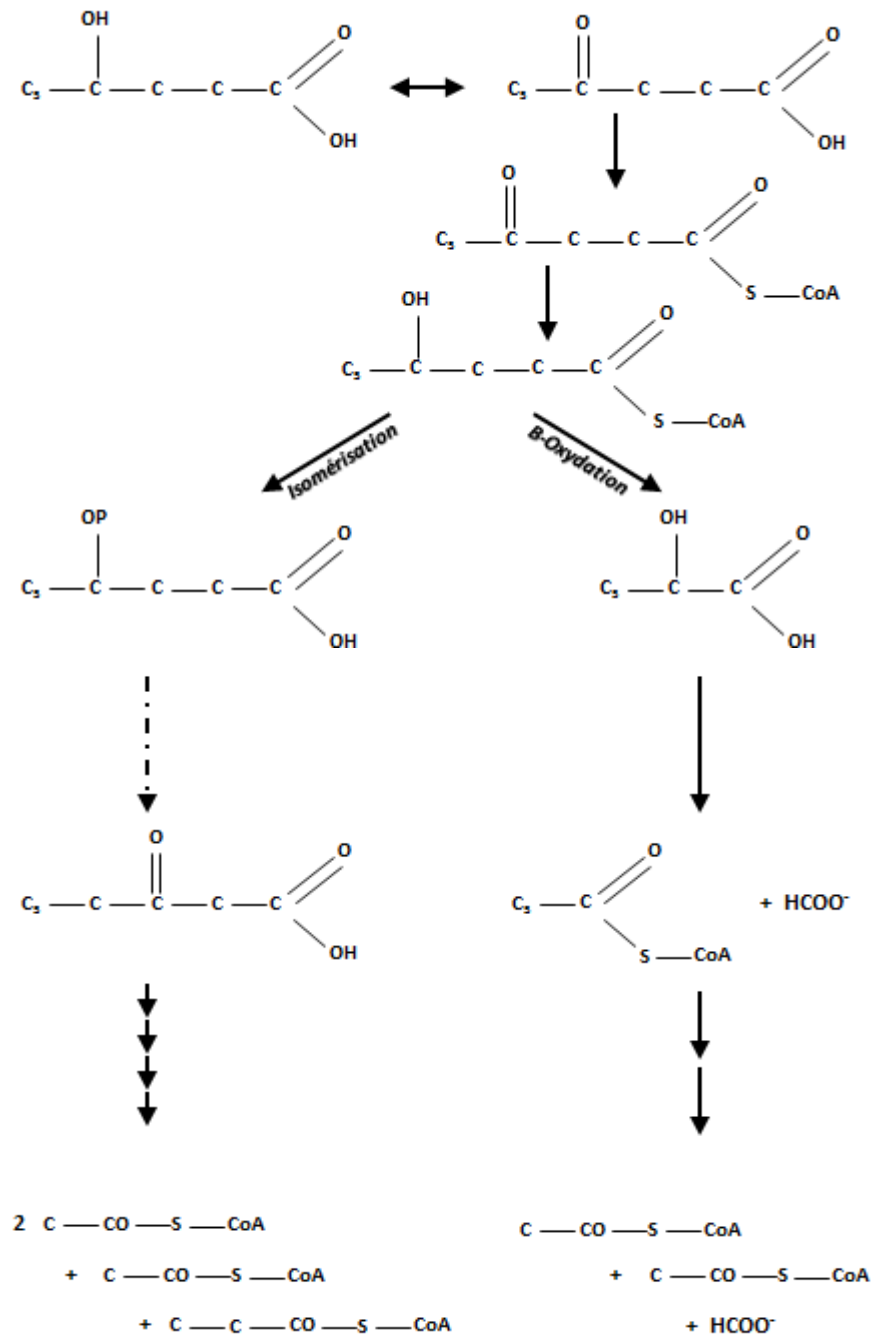


Figure 18 : Métabolisation du 4-hydroxynonanoate d'après Zhang et al [243]

- Les récepteurs Fas (apo/CD95). Le 4-HNE est susceptible d'activer l'expression du récepteur et conduire à l'activation des voies apoptotiques comme démontré sur des cellules épithéliales de lentille humaine [247].
- Les récepteurs N-Méthyl-D-Aspartate. L'aldéhyde est également responsable de la mort de cellules corticales neuronales par excitotoxicité induite par l'induction des récepteurs N-Méthyl-D-Aspartate. Ce phénomène a été également corrélé à une inactivation du NFκB [248].
- Les Serine/Thréonine kinase Akt. Il interfère clairement avec Akt (autrement appelé protéine kinase B). Aucun consensus n'est toutefois établi quant à l'effet exact de l'aldéhyde. Certaines études ont montré une inactivation de Akt par déphosphorylation, conduisant à la mort de cellules T leucémiques humaines [249] et une mort cellulaire précoce sur des cultures primaires de neurones corticaux de rat [250]. Au contraire, les travaux de Dozza *et al* mettent en évidence une inhibition de la glycogène synthase 3β dans des cellules humaines de neuroblastome, mais cette fois par phosphorylation et activation d'Akt [251]. Si on s'intéresse à un modèle plus physiologique de cellules musculaires lisses vasculaires (non cancéreuses), il a été mis en évidence que le 4-HNE activait la production de matrix metallo protease de type 2 (MMP-2) par co-activation du NFκB et d'Akt (par phosphorylation) [252].
- Les protéines kinase C. Dans une gamme de concentrations comprise entre 0,1 et 1 μM, le 4-HNE semble moduler le trafic et la sécrétion de protéines intracellulaires, par modulation positive des protéines kinase C Ca<sup>2+</sup> dépendantes [253, 254]. Cependant, il a été montré dans les hépatocytes de rat que lorsque la concentration augmente à 10 μM, cela se traduit en revanche par une régulation négative du cycle cellulaire et une induction apoptotique par le biais d'une isoforme particulière de la protéine kinase C δ, Ca<sup>2+</sup> indépendante [255].
- Les Mitogen-Activated Protein kinases (MAP kinases). De très nombreux travaux ont été entrepris concernant l'étude des interactions du 4-HNE avec les

MAP kinases et ont montré leur grande sensibilité à la molécule [256]. Les conséquences sur la c-jun N-terminal kinase (JNK) sont celles qui ont été les plus étudiées; l'activité proapoptotique de l'aldéhyde a été ainsi établie par sa liaison conduisant à la translocation du complexe 4-HNE-JNK vers le noyau [257, 258].

#### *3.3.2.2.15 4-HNE et physiopathologie hépatique humaine*

La présence de 4-HNE dans les maladies hépatiques a souvent été mise en évidence. De plus en plus de travaux non seulement l'identifient mais montrent également une corrélation entre les niveaux tissulaires et l'intensité de la nécro-inflammation observée. C'est le cas des affections chroniques du foie, dans lesquelles des adduits HNE-protéines ont été relevés dans 2/3 des biopsies [89, 119, 259]. D'autres études ont mis en évidence par immunohistochimie des LDL modifiés par le 4-HNE dans 2/3 des cas d'hématochromatose, de maladie de Wilson, de cirrhose biliaire, et dans certains cas de cirrhose alcoolique [260]. Des données publiées en 2003 font également état d'une augmentation des niveaux d'adduits HNE-protéines dans le cytoplasme des hépatocytes et des cellules sinusoidales en fonction de la stéatose et du degré d'inflammation des foies de patients atteints de cirrhose alcoolique [261].

Toutes ces données mettent en relief la relation entre le 4-HNE en tant que produit du stress oxydant et les maladies hépatiques. Ceci conduit à s'interroger sur le rôle exact joué par cet aldéhyde dans la progression de la nécro-inflammation. En d'autres termes, en est-il un déclencheur ou un facteur aggravant ?

#### *3.3.2.2.16 Impacts du 4-HNE sur l'expression génique*

Les processus par lesquels le 4-HNE régule ou perturbe l'expression de certains gènes ne sont pas encore clairs. Les travaux concernant son interaction avec le NFκB ont aboutis à des résultats controversés. Les effets observés varient en effet selon les types cellulaires et les concentrations utilisées.

La présence de très fortes concentrations d'aldéhyde, de 20 à 50  $\mu\text{M}$ , dans des cultures cellulaires induit essentiellement des effets inhibiteurs. L'activité transcriptionnelle du NF $\kappa$ B est inhibée dans des monocytes THP-1 [262], des cellules endothéliales aortiques humaines [263] et dans des ostéoblastes ostéoarthritiques humains après activation par le TNF- $\alpha$  [264].

Il a été toutefois démontré que des concentrations plus faibles, de l'ordre du  $\mu\text{M}$ , et donc plus physiologiques, pouvaient au contraire stimuler le NF $\kappa$ B. Ceci a été montré dans des cellules musculaires lisses vasculaires [265]. C'est également vrai pour des macrophages, qui répondent à des concentrations de 1 à 10  $\mu\text{M}$ . Toutefois ces données s'appliquent à des études réalisées sur des cultures cellulaires uniques. Dans un modèle plus complexe, où les macrophages ont été mis en co-culture avec des cellules souches hématopoïétiques humaines (hHSC), on a pu constater une insensibilité aux concentrations précédentes [266].

Prédire les effets du 4-HNE *in vivo* reste un donc exercice difficile, toutes les cellules ne présentent pas la même sensibilité à cette molécule et y répondent même de façon contradictoire. Il faut cependant spécifier qu'elles ne sont pas équipées du même système anti-oxydant, ni du même système de détoxification. Elles ne gèrent donc pas toutes le 4-HNE de la même façon, et ceci pourrait expliquer en partie les différences dans les résultats rapportés. Il est intéressant de se poser toutefois la question du véritable impact de cette molécule lorsqu'elle est infusée à des enfants prématurés.

### 3.3.2.3 Le *trans*-4-hydroxy-2-hexenal

Du fait de la proximité structurale et réactionnelle avec le 4-HNE, cette section sera plus concise et ne reprendra pas les mécanismes décrit précédemment.

#### 3.3.2.3.1 Chimie réactionnelle

Le mécanisme de formation à partir des AGPI de la série n-3 [121] est similaire à celui du 4-HNE, avec l'extraction d'un proton bis-allylique aux carbones 18 et 15 des



acides gras. Le même type de réactions se produit, libérant une molécule de 6 carbones. Les fonctions réactives sont identiques, lui conférant a priori les mêmes caractéristiques de réactivité vis-à-vis des espèces nucléophiles. Elle est susceptible de réagir avec les thiols ainsi qu'avec les amines primaires et secondaires [121].

#### 3.3.2.3.2 Cibles biochimiques du 4-HHE

Le 4-HHE peut se lier avec les protéines et les peptides *in vivo* [267] mais également avec les lipides et plus particulièrement avec les phospholipides contenant des phosphatidylethanolamine (PE) [180, 268].

Tout comme le 4-HNE, cet aldéhyde interagit également avec l'ADN et particulièrement avec les désoxyguanosine *via* une réaction d'addition de Michael, produisant une cyclisation au niveau du groupement amino N1 [221]. La formation de ces adduits présente la caractéristique d'être mutagénique [221].

#### 3.3.2.3.3 Métabolisme du 4-HHE, intermédiaires et réactions enzymatiques

Les réactions de détoxification du 4-HHE, même si elles mettent en jeu les mêmes enzymes de détoxification que pour le 4-HNE, semblent en revanche plus lentes en raison de la chaîne carbonée plus courte : des études de modélisation avec le 4-HNE ont notamment montré qu'elle était nécessaire pour un bon positionnement dans le site actif des ALDH *via* une interaction avec une phénylalanine en position 457 (F457) [269]. Comparé au 4-HNE, les 3 carbones de moins induiraient une perte d'affinité pour le site actif de l'ALDH, avec comme possible conséquence une augmentation des concentrations cellulaires de 4-HHE.

#### 3.3.2.3.4 *Impacts du 4-HHE sur la signalisation cellulaire*

La cytotoxicité du 4-HHE a été mise en évidence dans plusieurs modèles cellulaires, incluant les neurones de rat, les cellules endothéliales prostatiques YPEN-1 de rat, les cellules épithéliales du cristallin et les lymphocytes U937 humains. La dose létale mesurée se situe aux alentours de 20  $\mu\text{M}$  [196, 197, 270].

L'exposition au 4-HHE active également plusieurs mécanismes pro-apoptotiques :

Dans les cellules YPEN-1, l'exposition à des concentrations de 30  $\mu\text{M}$  de 4-HHE diminue le niveau de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et active la production d'ERO et de peroxy-nitrite [270].

Il a été montré capable de dépléter les concentrations de glutathion de neurones à partir d'une concentration de 10  $\mu\text{M}$ , ce qui le situe dans la même gamme d'activité biologique que le 4-HNE, et peut également à son instar augmenter le potentiel de membrane mitochondrial et créer un découplage par fuite de protons [196, 271].

#### 3.3.2.3.5 *Impacts du 4-HHE sur l'expression génique*

Les travaux les plus nombreux sont ceux concernant les effets sur le NF $\kappa$ B. Contrairement au 4-HNE dont l'activité biologique semble dépendante de sa concentration, le 4-HHE ne se comporte qu'en activateur du NF $\kappa$ B [272]. Dans les cellules YPEN-1, il active sa translocation, ce qui a également pour conséquence d'activer l'expression de la NOS inductible et la production de NO [272] (qui, en se combinant à l'anion superoxyde, produira du peroxy-nitrite). Toutefois, jusqu'à présent aucune activité pro-inflammatoire, à l'image du 4-HNE n'a encore été montrée.

## 4 Stress oxydant et pathologies du prématuré

Le processus engendré par la production de métabolites d'oxydation induit un état pro-oxydant normalement régulé par les systèmes de défenses anti-oxydantes. Lorsque ces protections sont faibles ou encore immatures, la charge oxydante ne peut être jugulée par l'organisme et l'on se trouve alors en situation de stress oxydant.

Il est clairement établi que ce dernier contribue au développement de plusieurs complications rencontrées chez le nouveau-né prématuré. Les pathologies les mieux documentées en pédiatrie néonatale, à savoir la dysplasie bronchopulmonaire et la rétinopathie du prématuré sont liées à la toxicité de l'oxygène et sa capacité à induire une production de radicaux libres.

***La dysplasie bronchopulmonaire (DBP)*** : Son développement se caractérise par un remodelage tissulaire qui tend vers une extension du nombre de fibroblastes et des régions fibrosées. Ces processus sont régulés par les métalloprotéases de la matrice (Matrix metalloproteins ou MMP). Plusieurs travaux ont montré que le stress oxydant a pour effet d'augmenter la production de MMP, ce qui endommage le tissu pulmonaire et augmente l'activité collagénase [273, 274].

Le déclenchement du stress oxydant est une des résultantes des fortes concentrations d'oxygène administrées du fait de la déficience en surfactant pulmonaire. Ceci est conjugué à l'immaturité des systèmes de défense anti-oxydante (voir paragraphe 1.3.2). Des études portant sur des souris à l'état fœtal et des rats nouveaux-nés exposés à plus de 50% d'oxygène ont montrés une inhibition irréversible de la croissance pulmonaire [275, 276]. Des indications plus précoces du rôle du stress oxydant ont également pu être apportées; des expériences menées sur des rats soumis à une hyperoxie et une infusion d'hypoxanthine ont montré la production d'anions superoxyde, d'hydroperoxydes et de peroxyde de nitrite susceptibles d'inactiver et rendre déficient le surfactant pulmonaire [277]. Oghiara *et al* ont

également mis en évidence des concentrations plasmatiques de 4-HNE plus élevées durant les 24 premières heures chez les enfants prématurés développant plus tard une DBP [278].

*La rétinopathie du prématuré (ROP)* est une complication majeure de la prématurité, caractérisée par une dégénérescence de la microvasculature oculaire. Dans ce cas, l'apport en oxygène consécutif à la ventilation mécanique va contribuer à l'oblitération vasculaire d'une rétine encore déficiente en défenses anti-oxydantes. Au niveau cellulaire et plus précisément mitochondrial, la réduction incomplète de l'oxygène par le complexe III provoque la génération d'ERO [279]. Ceci favorise la génération des  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , induisant par la suite la synthèse de thromboxane  $\text{TXA}_2$  dont il a été démontré l'importance dans la vasoblitération rétinienne. Des travaux ont également mis en évidence le rôle prépondérant du trans-arachidonate (isomérisation trans de l'arachidonate sous stress nitrosant) dans la dégénération vasculaire de la rétine chez la souris [280].

*Les troubles neurologiques* sont de deux types : Les hémorragies intra-craniennes et les leucomalacies périventriculaires. Si dans le cas des premières c'est la variation du débit sanguin cérébral qui est impliquée dans la genèse de la pathologie [281], le développement des leucomalacies est quant à lui plus complexe. La malacie de l'anneau périventriculaire survient à la suite d'évènements exogènes tels que le plus souvent, des perturbations hémodynamiques et/ou inflammatoires. Ces évènements sont directement à l'origine d'une production excessive de molécules pro-oxydantes, de cytokines pro-inflammatoires et de phénomènes d'exotoxicité par excès de glutamate [282-284].

## **4.1 Cas des maladies hépatiques**

Un grand nombre de maladies métaboliques peuvent se révéler en période néonatale par une atteinte hépatique prédominante en forme de cholestase, d'insuffisance hépatocellulaire ou d'hépatomégalie isolée ou associée.

De façon générale, les manifestations hépatiques de ces maladies peuvent être classées en 5 groupes :

- Celui aboutissant à une hyperbilirubinémie non conjuguée [285]
- Celui présentant une cholestase prédominante [10, 286-288]
- Celui ayant une insuffisance hépato-cellulaire avec nécrose [289, 290]
- Celui évoluant de façon récurrente par accès du type Syndrome de Reye [291].

On les qualifie de maladies métaboliques, fréquemment associées à des déficits de synthèse moléculaires et enzymatiques. Notre propos visant les affections potentiellement engendrées par les sources de molécules oxydantes, nous nous attarderons davantage la cholestase qui est fréquemment associée à l'utilisation de la TPN.

## **4.2 La cholestase**

### **4.2.1 Définition**

La cholestase est une diminution de la sécrétion biliaire avec d'importantes conséquences sur la fonction hépato-cellulaire [292]. Les analyses des biopsies faites chez les prématurés et les nouveau-nés suggèrent une réponse inflammatoire et des lésions hépatocellulaires avec augmentation de la prolifération ductulaire [10]. Du point de vue de l'anatomopathologiste, la cholestase associée à la NP présente initialement un infiltrat mixte lymphocytaire et neutrophilique périportal et des thrombi dans les canalicules biliaires, suivit d'une prolifération néoductulaire d'où peut survenir une fibrose jusqu'au développement d'une cirrhose biliaire [286, 287, 293]. Cette séquence n'est pas inhabituelle chez l'enfant recevant une alimentation parentérale prolongée. Des corrélations entre les données cliniques et histologiques hépatiques suggèrent la progression

chronologique des lésions hépatiques avec la durée de la TPN [294]. La cholestase est une lésion élémentaire parmi d'autres décrites sous l'entité d'hépatopathie liée à la NP.

Elle est une cause de morbidité et de mortalité chez les nouveau-nés et les enfants en NP prolongée. L'importance du tableau clinique et les nombreuses recherches sur l'étiologie de la cholestase liée à la nutrition parentérale n'ont pour le moment pas permis d'élucider son mécanisme. La meilleure compréhension de certains facteurs a pu déboucher sur une meilleure prise en charge de ces patients, mais il reste encore des aspects peu ou mal compris.

La cholestase liée à la NP est la plupart du temps potentiellement réversible, mais certains éléments sont plus susceptibles de prolonger le processus avec altération clinique, biologique et anatomopathologique, tels que le petit poids de naissance et la prématurité [10]. Elle se développe de façon progressive et peut mener à l'indication d'une transplantation hépatique.

#### **4.2.2 Composante inflammatoire : point de départ d'une pathogenèse hépatique...**

La physiopathologie de la cholestase liée à la nutrition parentérale est complexe. Elle fait intervenir de multiples facteurs de risque. Il est toutefois à noter qu'elle est fréquemment associée à une inflammation hépatique [295, 296].

Dans le cadre des dysfonctionnements sécrétoires biliaires qui sont responsables de son développement [286], des études *in vivo* et *in vitro* ont mis en évidence une diminution de sécrétion et de recapture des sels biliaires après stimulation par des cytokines pro-inflammatoires [297-300]. Du point de vue moléculaire, la stimulation par des cytokines proinflammatoires induit une chute d'expression des transporteurs de recapture *ntcp* et *oatp*, et d'exportation *bsep* et *mrp 2* des sels biliaires [288, 301]. La composante inflammatoire pourrait donc être l'élément déclencheur des problèmes de cholestase fréquemment rencontrés dans les unités de néonatalogie.

En parallèle toutefois, d'autres données ont suggéré un rôle du stress oxydant dans son induction. Belli *et al* ont démontré chez le rat que l'administration d'une NP pendant 5 jours provoquait une réduction du débit biliaire associée à une oxydation des lipides et des protéines hépatiques [302].

### 4.2.3 ... associée au stress oxydant ?

L'activation des cellules de Kupffer (macrophages résidents) et des infiltrats macrophagiques et neutrophiliques lors des phases aiguës de mort cellulaire est un processus connu lors des lésions hépatiques [303]. Il a été montré que dans les modèles d'induction inflammatoire par le lipopolysaccharide et dans les modèles d'ischémie-reperfusion, la cytotoxicité qui en résulte [304-306] est liée à la capacité des ERO formées par les neutrophiles à diffuser dans les hépatocytes situés à proximité [307, 308]. La génération d'ERO extracellulaires et particulièrement d'hypochlorite a d'ailleurs été prouvée par la quantification d'adduits chlorotyrosine dans ces deux modèles [309, 310], mais également dans les modèles de ligature des voies biliaires [293, 311].

Dans le cas de la cholestase, le mécanisme observé conduit à une mort cellulaire par nécrose, induite au préalable par une ouverture des pores mitochondriaux par perméabilité transitoire (*mitochondrial permeability transition*, MPT) [312]. Les ERO conduisent à ce phénomène de façon indirecte, par oxydation du NAD(P)H, consommation de  $\text{Ca}^{2+}$  et formation d'ERO mitochondriales [312]. De plus, une translocation des lysosomes vers les mitochondries a été identifiée; elle aggrave de façon synergique le dysfonctionnement par libération de leur fer et augmente le stress oxydant [313].

En plus de la MPT, la peroxydation lipidique à laquelle sont soumis les hépatocytes peut conduire à la destruction de leur membrane et à leur mort. Cependant, les données expérimentales restent mitigées sur son impact réel. Les expériences *in vitro* d'induction de mort cellulaire par peroxydation lipidique (par overdose d'acétaminophène) indiquent une

hausse des niveaux de 30 à 50 fois de MDA [314, 315]. En revanche, la majorité des expériences *in vivo* s'accorde au mieux sur une augmentation de 2 à 3 fois, ce qui est très loin des proportions précédentes [316].

La séquence de ces événements semble placer le stress oxydant en tant que réponse à une activation de cellules immunitaires. L'administration d'une NP change toutefois sensiblement le problème. Des études la mettent en cause pour expliquer la baisse du débit biliaire pouvant conduire à une cholestase. Il est intéressant de faire le lien avec les éléments présentés précédemment, les solutions infusées de nutrition parentérale contenant des oxydants sous forme radicalaires ou stables. Ces molécules peuvent être inductrices de phénomènes inflammatoires qui eux-mêmes peuvent être responsable de la diminution de l'expression des transporteurs des sels biliaires. Le stress oxydant par l'intermédiaire de l'oxydation des nutriments de la TPN pourrait donc être à l'origine des affections hépatiques telles que la cholestase.

## **5 Hypothèses et objectifs**

L'environnement périnatal peut influencer directement sur la santé des prématurés. La susceptibilité au stress oxydant de ces enfants est l'une des conséquences de l'immaturité de leurs défenses antioxydantes. De nombreux travaux ont d'ailleurs mis en évidence les effets biologiques de la mise en contact avec molécules oxydantes, telles que décrites dans la section 4 de ce manuscrit. C'est notamment le cas de l'oxygène. Même l'usage de l'oxygénothérapie dans les unités néonatales reste une des options choisies pour lutter contre une hypoxie cellulaire ou une hypoxémie, il est reconnu comme participant à la pathogénie de maladies liées au stress oxydant. La nutrition parentérale a également été montrée comme inductrice de mécanismes pathologiques dans certaines maladies hépatiques. Cependant dans ce cas, les études sont moins formelles; même si l'oxydation de



ses constituants a été mise en évidence depuis plus de 30 ans, les effets de l'infusion de ces entités oxydantes ne sont pas encore tout à fait clairs.

La peroxydation des lipides est une donnée extrêmement intéressante qui a déjà été étudiée dans le contexte de la nutrition parentérale. Les métabolites mesurés ouvrent cependant les portes à de nouvelles pistes de recherche : la formation d'hydroperoxydes lipidiques instables incite en effet à songer à une possible fragmentation en autres molécules connues pour leur réactivité et leur implication dans le stress oxydant.

L'utilisation de la TPN étant fréquemment associée à des pathologies à composante inflammatoire et associées au stress oxydant, nous avons émis l'hypothèse que *l'infusion chez les enfants prématurés, d'aldéhydes d'origine lipidique est en relation avec le développement du stress oxydant et de l'inflammation hépatique*. Dans ce contexte, l'objectif global du projet de thèse était d'analyser la relation entre les quantités d'hydroxy-alkénals dans la TPN et les effets hépatiques engendrés sur les marqueurs du stress oxydant et les voies de signalisation responsables de l'induction inflammatoire. Nous avons donc quantifié *in vitro* les concentrations d'hydroxy-alkénals générées dans l'émulsion lipidique de la TPN selon différentes modalités d'administration. Ceci a pu être réalisé grâce à la mise au point d'une méthode de dosage permettant de mesurer les niveaux de 4-hydroxynonanal et le 4-hydroxyhexenal. Par la suite, dans un modèle animal nous avons quantifié plusieurs marqueurs du stress oxydant hépatique, à savoir le potentiel redox du glutathion, les F<sub>2α</sub>-isoprostanes et les adduits GS-HNE. Au cours de cette même étude, nous avons étudié la modulation *in vivo* du NFκB. Nous avons examiné les liens entre les quantités d'aldéhydes infusés et la transcription des ARNm des cytokines pro-inflammatoires hépatiques *Tumor Necrosis Factor-α* (TNF-α), Interleukine-1 (IL-1) et Interleukine-8 (IL-8). Pour identifier la voie de signalisation impliquée, nous nous sommes basés sur la capacité connue du 4-HNE à activer la translocation du NFκB du cytosol vers le noyau (et potentiellement la transcription de gènes pro-inflammatoires). Dans cette optique nous avons quantifiés les niveaux cytoplasmiques et nucléaires de ce facteur de transcription et chercher à les mettre en relation avec la variation des niveaux de 4-HNE

infusés, de GS-HNE hépatiques (reflet du 4-HNE endogène), et la transcription des gènes pro-inflammatoires précédemment cités.

Après avoir montré la responsabilité du 4-HNE dans l'activation d'un processus pro-inflammatoire hépatique, l'objectif de notre seconde étude a été de réduire la production d'aldéhyde dans la NP. Nos investigations nous ont amenés à considérer 3 alternatives; la protection contre la lumière, l'ajout de multivitamines dans l'émulsion lipidique et l'enrichissement de cette dernière en AGPI n-3 afin de diminuer les potentiels substrats du 4-HNE (AGPI n-6). Nous avons donc quantifié les concentrations de 4-HNE et 4-HHE dans une émulsion lipidique enrichie en AGPI de la famille des n-3. Puis en utilisant le même modèle animal que dans la première étude, la modulation du stress oxydant a été évaluée par le redox du glutathion, les niveaux hépatiques des  $F_{2\alpha}$ -isoprostanes et les adduits GS-HNE et GS-HHE. La modulation de l'inflammation hépatique a quant à elle été évaluée par la mesure de la transcription des cytokines pro-inflammatoires hépatiques TNF- $\alpha$  et IL-1.

En se basant sur les données apportées par la littérature selon laquelle les enfants prématurés recevant du lait humain durant la phase de transition présentaient une meilleure protection anti-oxydante, *nous avons émis l'hypothèse que certains composés du lait humain pourraient réduire le développement du processus inflammatoire hépatique*. En travaillant en collaboration avec l'équipe du Dr Friel de l'Université du Manitoba, nous avons eu la possibilité d'utiliser deux hexapeptides à caractère anti-oxydant issus de l'hydrolyse des protéines du lait humain. Après des premiers tests effectués par nos collaborateurs, notre objectif était de tester les effets de l'adjonction de ces molécules dans les solutions nutritives sur la génération de molécules oxydantes. Par la suite, nous avons testé leur capacité à moduler le stress oxydant et juguler le processus inflammatoire hépatique associé à la NP.

*In vivo*, nos investigations ont été entreprises sur un modèle animal, le cochon d'Inde, de 3 jours de vie recevant une nutrition parentérale préparée quotidiennement,

durant 4 jours. Le mode d'administration binaire se décomposait de la façon suivante : 1% MV + 2.2% d'acides aminés + 8.7% dextrose et 1,5% de lipides administrés séparément. La NP était injectée dans la veine jugulaire *via* un catheter à une vitesse de 220 mL/kg/j, les animaux recevant donc 4,8 g/kg/j d'acides aminés et 3,2 g/kg/j de lipides. Les quantités choisies sont transposables à ce qu'un enfant prématuré sous NP peut recevoir en termes de quantités de lipides et d'acides aminés.

L'analyse des résultats obtenus (moyenne  $\pm$  sem) a été réalisée en analyse factorielle des variances (ANOVA) après vérification de l'homoscédasticité par un test  $\chi^2$  de Bartlett. Le dessin expérimental sous forme de factorielle permet de mettre en évidence les effets significatifs additifs ou encore synergiques.

## **ARTICLES**

## ARTICLE 1

Article soumis au *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 2011

### **Light protection of parenteral nutrition reduces hepatic accumulation of 4-hydroxynonenal and markers of inflammation in newborn guinea pig**

<sup>1</sup>Khalil Miloudi, M.Sc.; <sup>2</sup>Blandine Comte, Ph.D.; <sup>1</sup>Thérèse Rouleau, M.Sc.; <sup>1</sup>Jean-Claude Lavoie, Ph.D.

<sup>1</sup>*Pediatrics and Nutrition, CHU Sainte-Justine, University of Montreal, Montréal, QC, Canada;* <sup>2</sup>*INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, France; Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand, France*

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (MOP 77637).

**Key words:** Total parenteral nutrition; 4-Hydroxynonenal; NF- $\kappa$ B; cytokines; newborns

**ABSTRACT**

The absence of photoprotection of parenteral nutrition solutions used in premature infants favours the generation of peroxides and aldehydes such as 4-hydroxynonenal that are known to activate proinflammatory nuclear transcription factor-kappaB (NFκB). We hypothesized that 4-hydroxynonenal from parenteral nutrition contributes to hepatic inflammation. The aim of the study were to test whether photoprotection or admixing multivitamins to the lipid emulsion rather than the amino acid/dextrose moiety of the solution would prevent hepatic accumulation of 4-hydroxynonenal and markers of inflammation. Three-day-old guinea pigs were administered total parenteral nutrition for four days. Multivitamins were admixed to either the lipid or hydro-soluble moiety of the solution. The solutions were either light-protected or not. Peroxides and 4-hydroxynonenal were measured in parenteral nutrition and hepatic levels of 4-hydroxynonenal-glutathione adducts, F2α-isoprostane and indices of inflammation (NFκB activation; TNF-α and IL-1 mRNA) were determined. Results show that peroxide and 4-hydroxynonenal concentrations were higher in light-exposed solutions as well as in solutions where multivitamins were added to lipids. Livers from animals infused with parenteral nutrition lacking light protection demonstrated higher levels of hydroxynonenal-glutathione adducts, activation of NFκB and higher TNF-α and IL-1 mRNA. IL-1 was higher in animals infused with parenteral nutrition in which multivitamins were mixed to lipid emulsion. F2α-isoprostane levels did not differ between groups. In conclusion, results suggest that 4-hydroxynonenal infused within parenteral nutrition contributes to a hepatic inflammation that can be

prevented by an adequate light-protection of the nutritive solution but not by mixing multivitamins with lipid emulsion.

## **INTRODUCTION**

Premature and very low birthweight infants with immature gastrointestinal tracts require total parenteral nutrition (TPN). However, TPN is associated with the development of hepatic dysfunctions such as cholestasis,(1-4) the incidence of which increases with the duration of parenteral feeding (5). Since peroxides (6-8) and aldehydes (9) are known to be present in TPN solutions, they are suspected of involvement in these complications.

In North America, TPN is administered in binary fashion, i.e. two separate solutions mixed in close proximity to the infusion site: the lipid emulsion and the other nutrients (dextrose, amino acids, multivitamins, and electrolytes) (10). Multivitamins have been reported as responsible for the light-catalyzed generation of peroxides,(7,8) whereas the lipid emulsion is subject to auto-oxidation (6,9,11,12) leading to the generation of lipid peroxides (6,11,12) and aldehydes (9). The major aldehyde breakdown product from the peroxidation of n-6 polyunsaturated fatty acids is trans-4-hydroxy-2-nonenal (4-hydroxynonenal, 4-HNE) (13, 14). Its electrophilic nature makes 4-HNE highly reactive; (13,15-17) it interferes with proteins,(16,18-21) lipids,22-24 and DNA, (16,25) activating nuclear

transcription factor-kappaB (NFκB) (26) NFκB is involved in various processes including inflammation (27).

In vivo, 4-HNE is rapidly detoxified by glutathione S-transferase, the enzyme that catalyzes the formation of glutathionyl-4-hydroxynonanal (GS-HNE) (28-32). GS-HNE is further reduced by aldose reductase and alcohol dehydrogenase to glutathionyl-1,4-dihydroxynonene (GS-DHN), (33,34) which is actively exported into bile (34) or metabolized to mercapturic acid (33-35) In guinea pigs, the intravenous administration of TPN was reported to induce an accumulation of GS-HNE in the liver; when the animals were fed enterally, GS-HNE level was 25 times lower (36). These findings suggest either a surplus of aldehydes originating from the TPN solution and/or the impaired transport of GS-HNE into bile in those animals receiving TPN. Recently, several studies have associated an overexpression of proinflammatory cytokines with a decrease in the expression of the bile salt carriers Ntcp, Oatp, Bsep and Mrp2. However, although decreases in these carriers have been observed in cholestasis, (38-40) it is unclear whether inflammatory processes were a cause or consequence thereof. We hypothesized that 4-HNE from TPN solutions induces hepatic inflammation leading to hepatic complications.

The generation of peroxides and aldehydes in TPN can be diminished by photoprotection (8) However, adequate protection against ambient light is difficult to maintain in the



clinical setting, i.e. from preparation in the pharmacy to bedside. Alternatively, the addition of multivitamins containing antioxidants such as vitamin C directly into the lipid emulsion rather than into the amino acid/dextrose moiety of the TPN solution has been shown to limit lipid peroxidation (6,37). Based on these studies, the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism recommended adding multivitamins to the lipid emulsion (38).

The aims of the present study were to investigate whether oxidants such as peroxide or 4-HNE from TPN solutions induced hepatic inflammation; and if so, to test whether light protection or adding multivitamins to the lipid emulsion (MV-LIP) was the best way to reduce the levels of oxidants in TPN, and of inflammation markers in the liver.

## **METHODS and MATERIALS**

### *Experimental design*

The guinea pig model of neonatal parenteral nutrition has been well described in our previous studies (41-45). To test our hypothesis, induction of hepatic inflammation was identified by the translocation of NF- $\kappa$ B and an increase in mRNA levels of tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 (IL-1). Proinflammatory cell recruitment was assessed by measuring the increase in the levels of interleukin-8 (IL-8) mRNA (46).

Three-day-old guinea pig pups (N = 26) (Charles River, St. Constant, QC, Canada) were given binary TPN for 4 days by indwelling catheter secured in the right jugular vein. Two formulations were compared, with the multivitamins mixed into either the amino acid/dextrose or lipid emulsion:

1) MV-AA: 1% multivitamins solution (v/v) was added to the 2.2% (w/v) amino acid and 8.7% (w/v) dextrose moiety of TPN. The 1.5% (w/v) lipid emulsion was administered separately.

2) MV-LIP: 1% multivitamins solution (v/v) was added to the 1.5% (w/v) lipid emulsion. Amino acids and dextrose as above were administered separately.

TPN solutions were either protected from ambient light (66 foot-candles) or not. TPN was administered on a continuous basis (220 mL/kg/d), delivering 4.8 g/kg/d of amino acids and 3.2 g/kg/d of lipids. Solutions were changed daily.

The guinea pigs were housed in an animal facility controlled for a 12-hour light/dark cycle and constant temperature. After four days of TPN, the animals were sacrificed under ketamine/xylazine anesthesia. The liver was washed in 0.9% NaCl and rapidly minced on ice, subdivided and stored at -80° C until further analysis. This study was approved by the Institutional Review Board for the care and handling of animals, in accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

### *Materials*

We used Multi-12/K1 Pediatric multivitamins (Sandoz, Boucherville, QC, Canada), Travasol amino acid solution (Baxter, Mississauga, ON, Canada) and Intralipid 20% (Frenesius Kabi, Toronto, ON, Canada). We obtained unlabelled and [9, 9, 9-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-labelled 4-HNE (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI), NaB<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA), glutathione (Roche, Indianapolis, USA). Formic acid, NaBH<sub>4</sub>, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA), butylated hydroxytoluene (BHT), sodium dodecyl sulphate (SDS), 2,2-Bis-

(hydroxymethyl)-2,2',2''-nitrilotriethanol (Bis-Tris), Tris-hydrochloride (Tris-HCL) were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Trifluoroacetic acid was purchased from Fisher (NJ, USA). Acetonitrile and ethyl acetate were acquired from J.T. Baker (NJ, USA). All aqueous solutions were prepared in water purified by the Milli-Q system (Millipore, St. Laurent, Quebec, Canada). All other reagents were of analytical grade. We obtained mouse NF- $\kappa$ B primary antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), mouse anti-vinculin primary antibody (Abnova Corporation, Taipei, Taiwan), mouse-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (R&D Systems, Cedarlane Labs, Burlington, ON, CA) and Femto and Pico Chemiluminescent Substrates (Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). TRIzol reagent was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). QuantiTect Reverse Transcription kit and QuantiFast SYBR Green PCR kit were obtained from Qiagen, Montréal, Qc, Canada.

### *Determinations*

Hepatic F2 $\alpha$ -isoprostane levels were measured (42) using a commercial enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) according to instructions. Levels were expressed in fmol/mg protein.

Peroxide concentrations in TPN solutions were measured 3 hours after compounding, using the ferrous oxidation-xylenol orange method that measures a large spectrum of peroxides (43). Data presented correspond to the total hydroperoxide concentrations.

4-HNE: Mass spectrometry was used for quantification of free 4-HNE in a TPN solution and of GS-HNE in biological tissues. The approach was similar to that previously published for HNE-protein adducts, (46) allowing differentiation of aldehyde from alcohol forms by reduction with 1 M NaB<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, generating stable [2H<sub>1</sub>]DHN. Commercial HNE and [2H<sub>3</sub>]HNE, of which their concentrations were verified by absorbance at 223 nm, were used to synthesise the internal standards (IS). Glutathione-HNE adducts, namely GS-HNE and GS-[2H<sub>3</sub>]HNE, were synthesized by overnight reaction of aldehydes with a 10-fold excess of GSH at 37° C. Reduction of the free carbonyl group of HNE bound to glutathione was then performed with 1 M NaB<sub>2</sub>H<sub>4</sub> freshly prepared (methanol + 10 N NaOH, 36 fold excess, 30 min, 4°C), leading to the formation of GS-[1-2H]DHN and GS-[1,9,9,9-2H<sub>4</sub>]DHN respectively. The yield of the reaction was 92 ± 4% (n=10) for the formation of both adducts. The glutathione excess was eliminated using liquid chromatography (Agilent 1100, Eclipse Plus C18 Rapid Resolution 3.5 µm columns, 9% carbon load) pre-equilibrated with 0.1% formic acid at a flow rate of 1 mL/min. The compounds were eluted using a gradient of 0 to 60% solvent B on 20 min (solvent A: 0.1% aqueous trifluoroacetic acid; solvent B: 100% acetonitrile) at flow rate of 1 mL/min, followed by a 5 minutes wash with 90% B, and 10 minutes with 100% A.

Free 4-HNE in TPN solutions (1 mL) were directly quantified as dihydroxynonene (DHN) after reduction with 1 M NaBH<sub>4</sub> (200 µL) and the addition of deuterium-labelled internal standard (11 nmol). Determinations were performed on liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (Agilent LC-MS coupled with Agilent 1100 single quadrupole). Operating parameters included 60V cone voltage, 350° C source block temperature, and 12 L/min nitrogen nebulizer gas flow. The acquisition time was between 8 and 18 min for the measurement of a mass/charge ratio ( $m/z$ ) = 158 and 162 for DHN and [2H<sub>4</sub>]DHN, respectively, in single ion monitoring mode. Levels of DHN in TPN solutions represent the 4-HNE concentration and are expressed in µM 4-HNE.

GS-HNE levels in liver were determined on 0.5 g of tissue homogenized at 4°C with 1 mL of cold buffer (39 mM HEPES, 0.4 mM EDTA and 0.9 mM BHT, pH 7.4) immediately treated with 1 M NaB<sub>2</sub>H<sub>4</sub> and left on ice for 30 min. After the addition of internal standards (11 nmol) and protein precipitation with a solution of saturated SSA (200 µL), supernatants (100 µL) were injected on Phenomenex Pre-Column coupled with Agilent 1100 LC-MS. GS-HNE adducts were quantified as GS-[2H]DHN by LC-MS as described above, with an acquisition time between 10 and 18 min for the measurement of  $m/z$  = 467 and 470 for GS-[2H]DHN and GS-[2H<sub>4</sub>]DHN, respectively. Thus, levels of GS-[2H]DHN represent the GS-HNE quantities in liver and are expressed in pmol GS-HNE/mg protein.

The limit of detection determined with the internal standard was calculated to be 1  $\mu\text{M}$  or 10 pmol, for a 10  $\mu\text{L}$  injection volume. The calibration curve (1 to 1000 pmol) was linear in the tested range, with relative values standard deviations less than 5%. The calculated limit of quantification was determined as 3.4  $\mu\text{M}$ , or 34.4 pmol for a 10  $\mu\text{L}$  injection volume. The interassay coefficient of variation was 8.3%; the intra-assay coefficient of variation was 7.4 % (N = 12).

*NF- $\kappa$ B* was quantified in liver as follows: 200 mg of liver were added to 1 mL of cold sucrose buffer (320 mM sucrose, 4 mM HEPES-NaOH, pH 7.4) and 200  $\mu\text{L}$  of lysis buffer (Tris-HCl, pH 7.4) at 4°C. After homogenization followed by the addition of 2 mL of sucrose buffer, the solution was centrifuged at 980 x g for 10 min at 4°C. The supernatant was recovered and centrifuged at 100,000 g for 10 min. The cytosolic fraction was then kept on ice, whereas the pellet was washed in 1 mL sucrose buffer, centrifuged at 100,000 g for 30 min, and resuspended in 1 mL sucrose buffer to obtain an enriched nucleus fraction.

The protein concentrations of both fractions were determined by the Bradford assay and identical protein amounts were used for the next step. The samples were denatured in buffer containing SDS and  $\beta$ -mercaptoethanol, and proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (stacking gel 4%, separation gel 8%, 100V, molecular weight markers included). Proteins were electroblotted (100 V) onto polyvinylidene

fluoride (PVDF) membranes for 3 hours at 4°C. Nonspecific sites on the PVDF membrane were blocked by 1-hour incubation with defatted milk 5% in Tris-buffered saline with Tween 20 (TBST). Thereafter, the membrane was incubated overnight at 4°C with vinculin and NFκB primary antibodies diluted in defatted milk 2.5%. After washing in TBST, the membrane was incubated for 1 hour with mouse-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies followed by another washing step. A chemiluminescent solution (50% Femto - 50% Pico) was used for development on X-ray film. The density of each band was determined and normalized to vinculin.

*mRNA levels of TNF-α and IL-1*: To isolate total RNA, 100 mg liver was mechanically homogenized in 1 mL of TRIzol + 200 μL of chloroform and centrifuged at 31,200 g for 15 min at 4° C. The mRNA from the supernatant was precipitated in 500 μL isopropanol for 10 min, and centrifuged at 31,200 g for 10 min at 4° C. The pellet was washed in 500 μL of 70% ethanol and centrifuged at 31,200 g for 5 min at 4° C. The dried pellet (37° C, 1 hr) was resuspended in RNase-free water and heated until solubilization. The concentration of RNA in the sample was determined by the ratio of absorbance at 260 and 280 nm. Using the QuantiTect Reverse Transcription Kit, 100 ng was reverse-transcribed. The mRNA was quantified by real-time polymerase chain reaction (PCR) (Stratagene Mx3000P) using the QuantiFast SYBR Green PCR labelling method. Sequences of primer sets (5'-3') were designed using Primer3 Input software. They were for TNF-α: ATCTACCTGGGAGGCGTCTT (forward) and GAGTGGCACAAGGAACTGGT



(reverse); for IL-1: TGTGAAATGCCACCTTTTGA (forward) and GTAGCTGCCACAGCTTCTCC (reverse); for 18-S: GGCAGCCTTCCTGCTCTCT (forward) and CAGCTCCGAGACCAACTTTGT (reverse). The amplification protocol involved a denaturation at 95° C for 5 min followed by 40 cycles of annealing/extension (95° C for 10 sec, 64° C for 30 sec). Gene expression, or mRNA levels of target genes, was reported as the cycle number at which PCR target plots cross the threshold and normalized to the level of expression of 18S rRNA ( $\Delta$ CT). To obtain the relative changes in gene expression,  $\Delta$ CT was converted to  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ , as described by Livak and Schmittgen (47).

### **Statistical analysis**

Data were expressed as mean  $\pm$  SEM and verified for homoscedasticity by Bartlett's Chi-squared test. A logarithmic or root squared transformation was used when necessary to meet homoscedasticity. Data were then compared by factorial analysis of variance (2 x 2 ANOVA) for formulation and exposure to light. The factorial design allowed for the interpretation of significant effects as additive or synergetic (significant interaction). All comparisons were orthogonal. The threshold of significance was set at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

The *in vitro* generation of peroxides (Figure 1A) and 4-HNE (Figure 2A) in TPN solutions was positively affected by light exposure and mode of multivitamin administration. The absence of significant interaction ( $F(1,16) < 4.1$ ) between these parameters suggested that their effects were additive. Both peroxide and 4-HNE levels were higher in MV-LIP solutions ( $F(1,16) = 6.4$ ,  $P < 0.05$ ;  $F(1,16) = 9.0$ ,  $P < 0.01$ ; respectively) and in solutions lacking photoprotection ( $F(1,16) = 33.9$ ,  $F(1,16) = 79.1$ , respectively;  $P < 0.01$ ).

*In vivo*, the administration of TPN containing higher levels of peroxides and 4-HNE did not induce any significant changes in the hepatic levels of F2 $\alpha$ -isoprostane ( $F(1,19) < 0.14$ ). (Figure 1B). For GS-HNE concentrations in the liver (Figure 2B), the effects of light exposure of TPN and of multivitamin admixture were significant and additive, as suggested by the absence of interaction ( $F(1,15) = 0.7$ ). Not protecting TPN from light induced a 5-fold increase ( $F(1,15) = 240.8$ ,  $P < 0.01$ ) in GS-HNE levels, whereas the addition of multivitamins to the lipid emulsion led to a 1.3-fold increase ( $F(1,15) = 5.7$ ,  $P < 0.05$ ).

Protein levels of NF $\kappa$ B (Figure 3A & B) were modified by TPN exposure to light, which induced a reduction in cytosol levels ( $F(1,12) = 7.2$ ,  $P < 0.05$ ) and an increase in the nuclear fractions. Due to the large variation in nucleus levels, each data point was represented (with

a dot on the Figure 3B), with mean  $\pm$  SEM of  $0.54 \pm 0.22$  (n=8) that was significantly ( $P < 0.05$ ) different from zero. Nuclear NF $\kappa$ B was undetectable in samples from animals infused with TPN protected from the light. The mode of multivitamin admixture of TPN was without significant effect ( $F(1,12) < 1.2$ ). When the transcription level of two genes known to be stimulated by NF- $\kappa$ B, namely TNF- $\alpha$  and IL-1, was measured (Figure 4), hepatic TNF- $\alpha$  mRNA was higher ( $F(1,15) = 6.1$ ,  $P < 0.05$ ) in light exposed groups, without significant effect ( $F(1,15) = 2.5$ ) of the formulation or interaction ( $F(1,15) = 0.5$ ). For IL-1 mRNA, the effect of light-exposure ( $F(1,15) = 16.6$ ,  $P < 0.01$ ) and admixing MV into lipid emulsion ( $F(1,15) = 7.8$ ,  $P < 0.05$ ) were positive, without significant interactions ( $F(1,15) = 2.8$ ).

## **DISCUSSION**

The results of this study suggest that 4-HNE obtained from the administration of TPN induced inflammation in the livers of newborn guinea pigs. The best protection against both inflammation and the generation of 4-HNE in TPN solution was photoprotection of the intravenous solution. In addition, formulations in which multivitamins were mixed with the lipid emulsion (MV-LIP) were seen to increase 4-HNE formation in TPN as well as in the liver. A greater hepatic inflammatory response to MV-LIP was observed for IL-1 mRNA. The presence of dissolved oxygen in the TPN solution fosters the oxidation of nutrients that are electron donors such as vitamin C and polyunsaturated fatty acids, thus generating

organic and inorganic peroxides (6-8,44) and by-products of lipid peroxidation such as 4-HNE. These reactions are catalyzed by the photo-excited riboflavin (48). Shielding the TPN solutions from light is known to reduce peroxide accumulations by up to half, (8) a finding confirmed by our observations (Figure 1A). In contrast to accepted recommendations (37,38) however, our findings demonstrated that adding multivitamin preparations to the lipid emulsion moiety of TPN increased the generation of peroxides (Figure 1A) as well as that of 4-HNE (Figure 2A). The difference may be explained in part by the measurement of peroxides in total TPN for this study rather than in the isolated lipid emulsion in previous work. Secondly, the assay we used for peroxide determination did not discriminate lipid peroxides from other peroxides such as  $H_2O_2$ . The increased 4-HNE levels measured in MV-LIP strongly suggest that multivitamins do not protect the lipid emulsion from oxidation.

The absence of modification in hepatic  $F_{2\alpha}$ -isoprostane levels between groups suggests that peroxides from TPN do not induce an endogenous generation of free radicals that could induce further lipid peroxidation. The hepatic concentrations of  $F_{2\alpha}$ -isoprostane we found are similar to those previously reported with the same animal model infused with TPN (45). The presence of free radical scavenger molecules such as vitamins C and E in multivitamin preparation can explain the absence of free radical generation in vivo. Indeed, in comparison to infusion of  $H_2O_2$  alone, infusion of MV, which were contaminated with similar concentration of peroxides, preventing the generation of free radicals in liver (49).

Because both 4-HNE and  $F_{2\alpha}$ -isoprostanes result from free radical-induced lipid peroxidation, the absence of a change in  $F_{2\alpha}$ -isoprostanes suggests that the aldehydes (GS-HNE adducts) measured in liver samples of the light-exposed TPN groups originated from an exogenous source, such as TPN. This is further reinforced by the fact that hepatic levels of GS-HNE are 1,000 fold higher than the levels of  $F_{2\alpha}$ -isoprostanes (Figures 2B, 1B: pmol vs. fmol). Since GS-HNE concentration in liver in the same animal model at the same age but enterally fed was 20 times lower ( $2.4 \pm 0.2$  pmol/mg prot) (36) than the levels reported here for animals infused with TPN without photoprotection data presented in the Figure 2 support the fact that the quantities measured here must derive from the intravenous solution. On the other hand, the accumulation of GS-HNE in the liver can also be explained by a reduction in bile flow following an infusion of TPN as reported previously with the same animal model (41).

The increase in transcripts of TNF- $\alpha$  and IL-1 in the liver of animals infused with TPN solutions containing the highest level of 4-HNE, already observable after only four days of TPN, suggests that the inflammatory response begins early after initiation of TPN. The early inflammatory response resulting from the activation of NF $\kappa$ B by 4-HNE could be a major driving force leading to the development of liver disease associated with TPN. A further histological study would be necessary to determine if the process derived from hepatic cells themselves or from migration of inflammatory cells. Moreover, the link between elevated inflammatory markers and decreased expression of transporters involved

in the release of bile salts has been identified as one aspect of the intra-hepatic cholestasis (39,40,50). Further studies are needed to investigate the impact of infused 4-HNE on the incidence and severity of cholestasis in premature infants on TPN.

In conclusion, our observations suggest that clinically, TPN solutions should be protected from light at all times. Furthermore, counter to current recommendations, it would probably be best for the multivitamins to be added to the amino acid/dextrose moiety of TPN, rather than to the lipid emulsion.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful to Danielle Buch, medical writer/editor at the Applied Clinical Research Unit of the Sainte-Justine Research Centre, for critical revision and editing of the manuscript.

**REFERENCES**

1. Willis TC, Carter BA, Rogers SP, Hawthorne KM, Hicks PD, Abrams SA. High rates of mortality and morbidity occur in infants with parenteral nutrition-associated cholestasis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2010;34:32-7.
2. Rollins MD, Scaife ER, Jackson WD, Meyers RL, Mulroy CW, Book LS. Elimination of soybean lipid emulsion in parenteral nutrition and supplementation with enteral fish oil improve cholestasis in infants with short bowel syndrome. *Nutr Clin Pract.* 2010;25:199-204.
3. Raman M, Allard JP. Parenteral nutrition related hepato-biliary disease in adults. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2007;32:646-54.
4. Puder M. Infant parenteral nutrition-associated cholestasis: a severe iatrogenic disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2010;34:94-5.
5. Baserga MC, Sola A. Intrauterine growth restriction impacts tolerance to total parenteral nutrition in extremely low birth weight infants. *J Perinatol.* 2004;24:476-81.
6. Silvers KM, Darlow BA, Winterbourn CC. Lipid peroxide and hydrogen peroxide formation in parenteral nutrition solutions containing multivitamins. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2001;25:14-7.
7. Lavoie JC, Belanger S, Spalinger M, Chessex, P. Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition: the major contributor to in vitro generation of peroxides. *Pediatrics.* 1997;99:E6.

8. Laborie S, Lavoie JC, Pineault M, Chessex, P. Contribution of multivitamins, air, and light in the generation of peroxides in adult and neonatal parenteral nutrition solutions. *Ann Pharmacother.* 2000;34:440-5.
9. Pitkanen O, Hallman M, Andersson S. Generation of free radicals in lipid emulsion used in parenteral nutrition. *Pediatr Res.* 1991;29:56-9.
10. Gillies D, O'Riordan L, Wallen M, Morrison A, Rankin K, Nagy S. Optimal timing for intravenous administration set replacement. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005:CD003588.
11. Pitkanen OM. Parenteral lipids and the preterm infant: between Scylla and Charybdis. *Acta Paediatr.* 2004;93:1028-30.
12. Pitkanen OM. Peroxidation of lipid emulsions: a hazard for the premature infant receiving parenteral nutrition? *Free Radic Biol Med.* 1992;13:239-45.
13. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991;11:81-128.
14. Siems WG, Grune T, Esterbauer H. 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine. *Life Sci.* 1995;57:785-9.
15. Petersen DR, Doorn JA. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med.* 2004;37:937-45.
16. Poli G, Schaur RJ. 4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. *IUBMB Life.* 2000;50:315-21.



17. Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev.* 2008;28:569-631.
18. Uchida K, Szwedda LI, Chae HZ, Stadtman ER. Immunochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in oxidized hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:8742-6.
19. Hashimoto M, Sibata T, Wasada H, Toyokuni S, Uchida K. Structural basis of protein-bound endogenous aldehydes. Chemical and immunochemical characterizations of configurational isomers of a 4-hydroxy-2-nonenal-histidine adduct. *J Biol Chem.* 2003;278:5044-51.
20. Danielson UH, Esterbauer H, Mannervik B. Structure-activity relationships of 4-hydroxyalkenals in the conjugation catalysed by mammalian glutathione transferases. *Biochem J.* 1987;247:707-13.
21. Carbone DL, Doorn JA, Petersen DR. 4-Hydroxynonenal regulates 26S proteasomal degradation of alcohol dehydrogenase. *Free Radic Biol Med.* 2004;37:1430-9.
22. Leonarduzzi G, Chiarpotto E, Biasi F, Poli G. 4-Hydroxynonenal and cholesterol oxidation products in atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res.* 2005;49:1044-9.
23. Guichardant M, Taibi-Tronche P, Fay LB, Lagarde M. Covalent modifications of aminophospholipids by 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med.* 1998;25:1049-56.
24. Bacot S, Bernoud-Hubac N, Baddas N, Chantegrel B, Deshayes C, Doutheau A, Lagarde M, Guichardant M. Covalent binding of hydroxy-alkenals 4-HDDE, 4-HHE, and 4-HNE to ethanolamine phospholipid subclasses. *J Lipid Res.* 2003;44:917-26.

25. Kowalczyk P, Ciesla JM, Komisarowski M, Kuśmierk JT, Tudek B. Long-chain adducts of trans-4-hydroxy-2-nonenal to DNA bases cause recombination, base substitutions and frameshift mutations in M13 phage. *Mutat Res.* 2004;550:33-48.
26. Ruef J, Moser M, Bode C, Kübler W, Runge MS. 4-hydroxynonenal induces apoptosis, NF-kappaB-activation and formation of 8-isoprostane in vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol.* 2001;96:143-50.
27. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1:a001651.
28. Zimniak L, Awasthi S, Srivastava SK, Zimniak P. Increased resistance to oxidative stress in transfected cultured cells overexpressing glutathione S-transferase mGSTA4-4. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997;143:221-9.
29. Yadav UC, Ramana KV, Awasthi YC, Srivastava SK. Glutathione level regulates HNE-induced genotoxicity in human erythroleukemia cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;227:257-64.
30. Srivastava SK, Singhal SS, Bajpai KK, Chaubey M, Ansari NH, Awasthi YC. A group of novel glutathione S-transferase isozymes showing high activity towards 4-hydroxy-2-nonenal are present in bovine ocular tissues. *Exp Eye Res.* 1994;59:151-9.
31. Srivastava SK, Singhal SS, Awasthi S, Pikula S, Ansari NH, Awasthi YC. A glutathione S-transferases isozyme (bGST 5.8) involved in the metabolism of 4-hydroxy-2-trans-nonenal is localized in bovine lens epithelium. *Exp Eye Res.* 1996;63:329-37.

32. Singhal SS, Awasthi S, Srivastava SK, Zimniak P, Ansari NH, Awasthi YC . Novel human ocular glutathione S-transferases with high activity toward 4-hydroxynonenal. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36:142-50.
33. Alary J, Debrauwer L, Fernandez Y, Cravedi JP, Rao D, Bories G. 1,4-Dihydroxynonene mercapturic acid, the major end metabolite of exogenous 4-hydroxy-2-nonenal, is a physiological component of rat and human urine. *Chem Res Toxicol.* 1998;11:130-5.
34. Alary J, Gueraud F, Cravedi JP. Fate of 4-hydroxynonenal in vivo: disposition and metabolic pathways. *Mol Aspects Med.* 2003;24:177-87.
35. Alary J, Bravais F, Cravedi JP, Debrauwer L, Rao D, Bories G. Mercapturic acid conjugates as urinary end metabolites of the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal in the rat. *Chem Res Toxicol.* 1995;8:34-9.
36. Miloudi K, Tsopmo A, Friel JK, Rouleau T, Comte B, Lavoie JC. Hexapeptides from human milk prevent the induction of oxidative stress from parenteral nutrition in the newborn guinea pig. *Pediatr Res.* In revision 11/2011
37. Silvers KM, Sluis KB, Darlow BA, McGill F, Stocker R, Winterbourn CC. Limiting light-induced lipid peroxidation and vitamin loss in infant parenteral nutrition by adding multivitamin preparations to Intralipid. *Acta Paediatr.* 2001;90:242-9.
38. Koletzko B, Goulet O, Hunt J, Krohn K, Shamir R; Parenteral Nutrition Guidelines Working Group; European Society for Clinical Nutrition and Metabolism; European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN); European Society of Paediatric Research (ESPR). 1. Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of

the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR). *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005;41 Suppl 2:S1-87.

39. Li D, Zimmerman TL, Thevananther S, Lee HY, Kurie JM, Karpen SJ. Interleukin-1 beta-mediated suppression of RXR:RAR transactivation of the Ntcp promoter is JNK-dependent. *J Biol Chem.* 2002;277:31416-22.

40. Geier A, Zollner G, Dietrich CG, Wagner M, Fickert P, Denk H, van Rooijen N, Matern S, Gartung C, Trauner M. Cytokine-independent repression of rodent Ntcp in obstructive cholestasis. *Hepatology.* 2005;41:470-7.

41. Lavoie JC, Chessex P, Gauthier C, Levy E, Alvarez F, St-Louis P, Rouleau T. Reduced bile flow associated with parenteral nutrition is independent of oxidant load and parenteral multivitamins. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005;41:108-14.

42. Lavoie JC, Rouleau T, Tsopmo A, Friel J, Chessex P. Influence of lung oxidant and antioxidant status on alveolarization: role of light-exposed total parenteral nutrition. *Free Radic Biol Med.* 2008;45:572-7.

43. Lavoie JC, Laborie S, Rouleau T, Spalinger M, Chessex P. Peroxide-like oxidant response in lungs of newborn guinea pigs following the parenteral infusion of a multivitamin preparation. *Biochem Pharmacol.* 2000;60:1297-303.

44. Maghdessian R, Cote F, Rouleau T, Ben Djoudi Ouadda A, Levy E, Lavoie JC. Ascorbylperoxide contaminating parenteral nutrition perturbs the lipid metabolism in newborn guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;334:278-84.

45. Chessex P, Lavoie JC, Rouleau T, Brochu P, St-Louis P, Lévy E, Alvarez F. Photooxidation of parenteral multivitamins induces hepatic steatosis in a neonatal guinea pig model of intravenous nutrition. *Pediatr Res.* 2002;52:958-63.
46. Veronneau M, Comte B, Des Rosiers C. Quantitative gas chromatographic-mass spectrometric assay of 4-hydroxynonenal bound to thiol proteins in ischemic/reperfused rat hearts. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:1380-8.
47. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25:402-8.
48. Laborie S, Lavoie JC, Chessex P. Paradoxical role of ascorbic acid and riboflavin in solutions of total parenteral nutrition: implication in photoinduced peroxide generation. *Pediatr Res.* 1998;43:601-6.
49. Chessex P, Lavoie JC, Laborie S, Rouleau T. Parenteral multivitamin supplementation induces both oxidant and antioxidant responses in the liver of newborn guinea pigs. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001;32 :316-21.
50. Donner MG, Schumacher S, Warskulat U, Heinemann J, Häussinger D. Obstructive cholestasis induces TNF-alpha- and IL-1 -mediated periportal downregulation of Bsep and zonal regulation of Ntcp, Oatp1a4, and Oatp1b2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293:G1134-46.

**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1. Peroxide concentrations in total parenteral nutrition solutions and F2 $\alpha$ -isoprostane levels in liver.**

Levels of peroxides (Panel A) generated in total parenteral nutrition (TPN) formulations where multivitamins were mixed with either the amino acid (MV-AA) or lipid (MV-LIP) moiety. TPN solutions were either light-protected or exposed to light. Panel B shows the hepatic F2 $\alpha$ -isoprostane levels measured in guinea pigs, each infused with one of the solutions. The positive effects of light exposure and the addition of multivitamins to the lipid moiety of TPN on peroxides were additive. Light exposure and formulation had no significant effect on hepatic F2 $\alpha$ -isoprostane levels. Means  $\pm$  SEM, n = 4-6, \* P <0.05, \*\* P < 0.01.

**Figure 2. 4-HNE concentrations in total parenteral nutrition solutions and GS-HNE levels in liver.**

Levels of 4-hydroxynonenal (4-HNE) (Panel A) generated in total parenteral nutrition (TPN) formulations where multivitamins were mixed with either the amino acid (MV-AA) or lipid (MV-LIP) moiety. TPN solutions were either light-protected or exposed to light. Panel B shows the hepatic glutathionyl-4-hydroxynonenal (GS-HNE) levels measured in guinea pigs, each infused with one of the solutions. The positive effects of light exposure and the addition of multivitamins to the lipid moiety of TPN on 4-HNE and GS-HNE were additive. Means  $\pm$  SEM, n = 4-6, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01.

**Figure 3. Hepatic NF $\kappa$ B activation.**

Animals received intravenous total parenteral nutrition (TPN) in one of two different formulations, where multivitamins were mixed with either the amino acid (MV-AA) or lipid (MV-LIP) moiety. TPN solutions were either light-protected or exposed to light. A. Cytosol NF $\kappa$ B levels were lower in groups where TPN was exposed to light. B. Nuclear NF $\kappa$ B was detectable only in light-exposed groups; each data point is represented by a dot. Means  $\pm$  SEM, n = 4, \* P < 0.05.

**Figure 4. Hepatic pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  and IL-1 expression.**

Animals received intravenous total parenteral nutrition (TPN) in one of two different formulations, where multivitamins were mixed with either the amino acid (MV-AA) or lipid (MV-LIP) moiety. TPN solutions were either light-protected or exposed to light. A. TNF- $\alpha$  transcription level was significantly higher in groups where TPN was exposed to light. B. The effect of light exposure on IL-1 was dependent on TPN formulation. The positive effect of light exposure was observed only in animals receiving MV-LIP. Means  $\pm$  SEM, n = 4 or 5, \* P < 0.05.



Figure 1

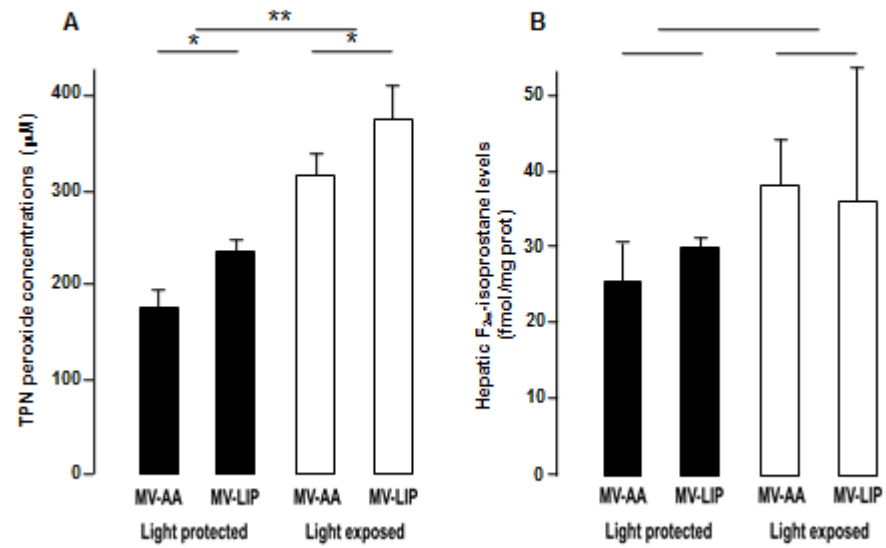


Figure 2

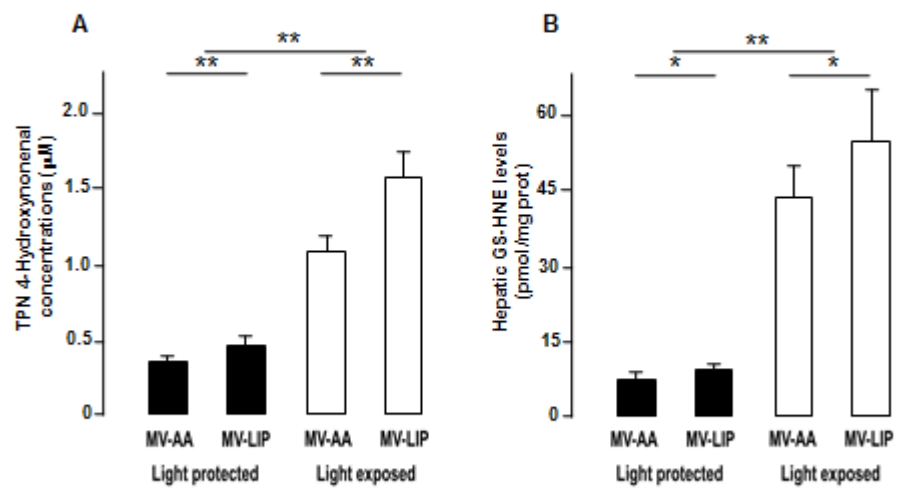


Figure 3

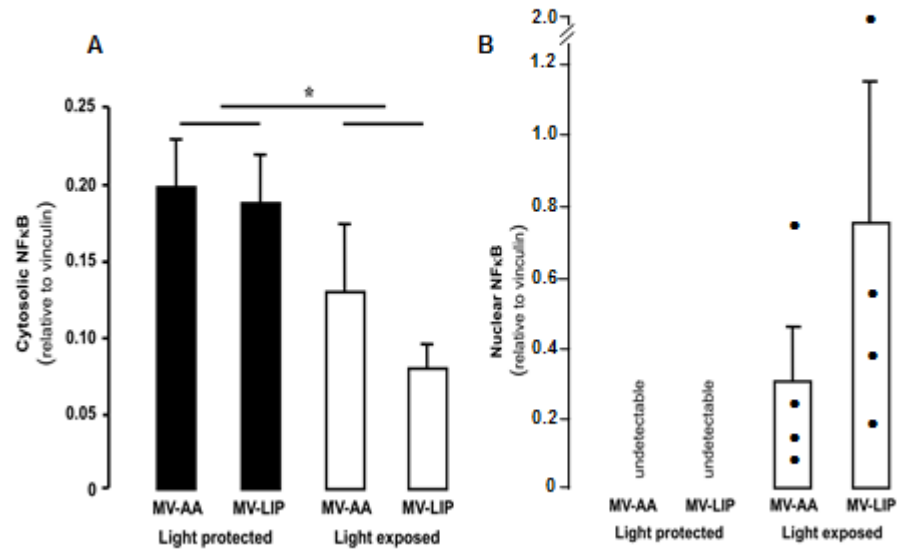
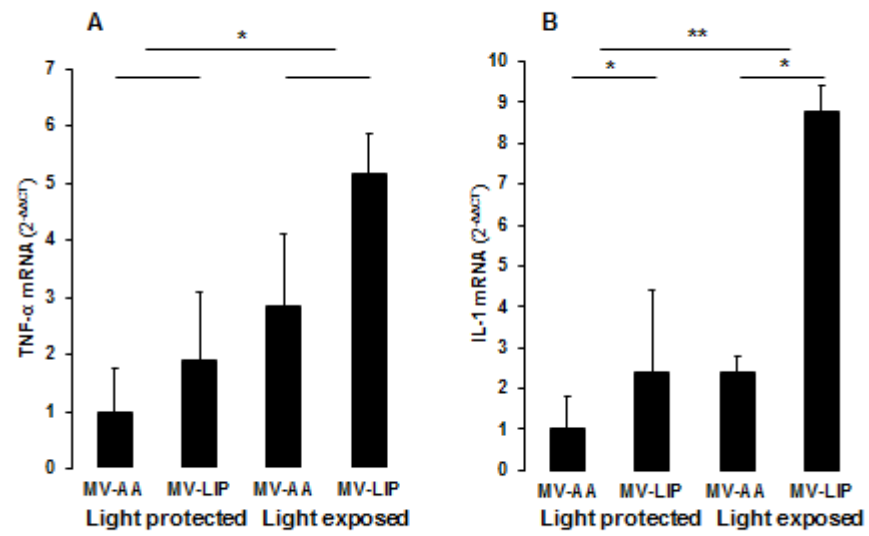


Figure 4





## ARTICLE 2

Article en révision dans *Clinical Nutrition*, 2011

### **The mode of administration of total parenteral nutrition and nature of lipid content influence the generation of peroxides and aldehydes**

Khalil Miloudi <sup>1</sup>, Blandine Comte <sup>3</sup>, Thérèse Rouleau <sup>1,2</sup>, Alain Montoudis <sup>2</sup>, Emile Levy <sup>2</sup>, and Jean-Claude Lavoie <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Department of Pediatrics, CHU Sainte-Justine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada*; <sup>2</sup> *Department of Nutrition, CHU Sainte-Justine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada*; <sup>3</sup> *INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, France; Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand, France*

*Short Running Title: Peroxide and aldehyde generation in TPN*

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (MOP 77637).

**Key words:** Total parenteral nutrition; 4-Hydroxynonenal; NF- $\kappa$ B; cytokines; newborns

**Abbreviations:** AA: hydrosoluble moiety of TPN (amino acids, dextrose and electrolytes); FAO: fatty acids oxidative index; GS-HNE: glutathionyl 1,4-dihydroxynonenal adduct; GS-HHE: glutathionyl 1,4-dihydroxyhexenal adduct; GSH: reduced form of glutathione; GSSG: disulfure form of glutathione; HHE: 4-hydroxyhexenal; HNE: 4-hydroxynonenal; IL-1: interleukine-1; -L: photo-protected; +L: without photo-protection; LIP: lipid emulsion; MVP: multivitamin preparation; MUFAs: monounsaturated fatty acids; PUFAs: poly-unsaturated fatty acids; TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor; TPN: total parenteral nutrition.

## ABSTRACT

**Background & Aims:** The absence of light-protection of total parenteral nutrition (TPN) for premature newborns favors the generation of 4-hydroxynonenal and peroxides. 4-Hydroxynonenal is suspected to be involved in TPN-related liver complications. Aims: find the best way to reduce 4-hydroxynonenal in TPN and assess *in vivo* the impact of TPN containing low 4-hydroxynonenal concentration.

**Methods:** Six modes of TPN were compared for the *in vitro* generation of peroxides and 4-hydroxynonenal: 1) MV-AA-L: light-protected (-L) solution containing multivitamin (MV) mixed with amino acids + dextrose (AA); 2) MV-AA+L: MV-AA without photo-protection (+L); 3) MV-LIP+L: MV mixed with lipid emulsion (LIP). LIP was a) *Intralipid20%*<sup>®</sup> or b) *Omegaven*<sup>®</sup>. Hepatic oxidative stress markers (glutathione, F<sub>2α</sub>-isoprostanes, GS-HNE) and mRNA of TNF- $\alpha$  and IL-1 were measured in newborn guinea pigs infused during 4-days with MV-AA+L compounding with *Intralipid20%*<sup>®</sup> or *Omegaven*<sup>®</sup>.

**Results:** Hydroperoxide and 4-hydroxynonenal were the lowest in MV-AA-L and the highest in MVLIP+L. MV-AA+L with *Omegaven*<sup>®</sup> was associated with the lowest oxidative stress markers and lowest mRNA of TNF- $\alpha$  and IL-1.

**Conclusion:** Because light protection of TPN is difficult to address in clinical situation, the results suggest that, compared to *Intralipid20%*<sup>®</sup>, the use of *Omegaven*<sup>®</sup> reduces oxidative stress associated with TPN and can prevent liver inflammation.

**Key words:** Hepatic oxidative stress; inflammation; lipid emulsion; premature newborn; total parenteral nutrition.

## INTRODUCTION

Premature and very-low-birth-weight newborns frequently need total parenteral nutrition (TPN) as nutritive supplement because the immaturity of their gastrointestinal tract. However, TPN is associated with several complications such as cholestasis (1). The causes of this association remain largely unknown. In the past 20 years, TPN components have been studied and barely identified as inducers of hepatic failures. Since TPN solutions are contaminated with oxidant molecules such as peroxides (2,3) and aldehydes (4), oxidative stress and its consequences have been cited as a possible cause. Multivitamin preparation (MVP) of TPN is the main source for peroxide generation in the solution (2). The presence of the photo sensitizer riboflavin allows using the energy from ambient light to accelerate the electron transfer between vitamin C, or other electron donor such as polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (5), and dissolved oxygen to generate hydrogen peroxide (3). The solution photoprotection reduced by half peroxide concentration (3). It is now well known that oxidative stress, which can be induced by infusion of peroxides, may be an activator of inflammation, a condition frequently associated with liver failure (6). Since the expression of several bile transporters such as *ntcp*, *oatp*, *bsep*, and *mrp 2* is associated with pro-inflammatory cytokines (7) peroxides from TPN have been suspected to be involved in cholestasis. However, the reduced bile flow rate observed in newborn animals infused with TPN was not influenced by the presence of MVP or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (8). Lipid emulsion is the other important source of oxidant molecules in TPN. Indeed, PUFAs are excellent electron donors for dissolved oxygen to produce both H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and free radicals that will progress into free radical chain reaction leading to peroxidation of PUFAs. The aldehyde 4-

hydroxynonenal (4-HNE) is a major breakdown product of n-6 PUFAs peroxidation (9). This highly reactive molecule covalently binds with proteins (10), lipids (11) and DNA (12), interfering with their functions. By its interaction with transcription factor NF $\kappa$ B, 4-HNE can modulate the inflammatory response. The presence of this aldehyde is reported in several hepatobiliary damages and diseases (13) and is therefore, suspected to be involved in TPN-induced cholestasis. The objective of the present study was to find the best way to reduce 4-HNE generation in TPN. One of them is light protection of TPN that reduces oxidative reactions by blocking the input of energy from light carried by riboflavin. However, in the clinical routine, it is difficult to adequately photo-protect TPN. A second way is to add MVP, which contains antioxidant molecules such as vitamin C, into the lipid emulsion in prevention of lipid peroxidation. In Nord America, TPN is administered as a combination of two solutions: the hydro-soluble components (amino acids + dextrose + MVP + electrolytes) being mixed to lipid emulsion only close to the site of infusion. The *European Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition Metabolism* recommends adding MVP into the lipid emulsion rather than into the hydro-soluble part of TPN to prevent oxidation of lipids in triglyceride hydroperoxides (14). A third alternative might be to modify the ratio of n-6/n-3 PUFAs in the lipid emulsion. Although n-3 PUFA's peroxidation leads to the generation of 4-hydroxyhexenal (4-HHE) (15) that can also form adducts (16,17), its biological effects remain to be clarified. In fact, n-3 PUFAs have been reported to reduce the release of proinflammatory cytokines such as Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ) in human alveolar cells (18) and to suppress inflammatory response in cultured macrophages and hepatocytes (19).



Therefore, the aim of this study was first to assess the capacity of these three modes of TPN administration to generate peroxides and aldehydes, and second to measure in a newborn guinea pig model, the impact of the best option in reducing 4-HNE concentration in TPN, compared to the actual clinical standard of TPN administration (without adequate photo-protection and MVP mixed with hydro-soluble components) on hepatic levels of proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 mRNA.

## **MATERIALS**

### *Materials*

*Omegaven*<sup>®</sup> and *Intralipid20%*<sup>®</sup> were obtained from Fresenius Kabi (GmbH, Austria and Toronto, ON, Canada), *Travasol*<sup>®</sup> (amino acid solution) from Baxter (Mississauga, ON, Canada) and Multi-12 pediatrics<sup>®</sup> (MVP) from Sandoz (Boucherville, Qc, Canada). Unlabeled and [9,9,9-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]trans-4-hydroxy-2-nonenal were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). NaB<sub>2</sub>H<sub>4</sub> was supplied by Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). Reduced and disulfide glutathione were purchased from Roche (Indianapolis, USA). NaBH<sub>4</sub>, N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES), ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), butylated hydroxytoluene (BHT), sodium dodecyl sulphate (SDS), Bis-Tris, Tris-HCL and 5-sulfosalicylic acid (SSA) were obtained from Sigma (St Louis, MO). Metaphosphoric acid was purchased from Fisher (NJ, USA). Acetonitrile and ethyl acetate were acquired from J.T. Baker (New Jersey, USA). TRIZOL reagent was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). QuantiTect Rev., transcription kit and QuantiFast SYBR Green PCR kit were obtained from Qiagen. All aqueous solutions were prepared in water purified by Milli-Q system (Millipore, St. Laurent, Quebec, Canada). All other reagents were of analytical grade.

### *Experimental design*

#### *In vitro* protocols:

TPN mixture was composed of two solutions: AA (containing amino acids and dextrose) and LIP (lipid emulsion). MVP were added to AA or LIP. The final concentration was

2.2% (w/v) for amino acids, 8.7% (w/v) for dextrose, 1.5% (w/v) for lipid emulsion, and 1% (v/v) for MVP. In order to mimic a clinical situation, LIP and AA were incubated separately 5 hrs at room temperature before being mixed.

The final combination (AA+LIP) was incubated 1 hr before sampling and analyses. The following admixtures were compared for the generation of aldehydes, peroxides and the quality of lipids:

□□ MVP-AA (MVP into AA) exposed to ambient light (+Light; 66 foot candles); this TPN solution was considered as the control since it is the standard used in neonatal units. Lipid emulsion was *Intralipid20%*<sup>®</sup>, which is made up of soybean oil (20%), glycerin (2.25%) and egg phospholipids (1.2%), which reach a total caloric value of 2.0 kcal/mL.

□□ MVP-AA protected from ambient light (-Light), with *Intralipid20%*<sup>®</sup>; the first alternative to prevent aldehyde generation.

□□ MVP-LIP (MVP into LIP) +Light, with *Intralipid20%*<sup>®</sup>; the second alternative to prevent aldehyde generation.

□□ The third alternative was to use *Omegaven*<sup>®</sup> rather than *Intralipid20%*<sup>®</sup> as source of lipids. *Omegaven*<sup>®</sup> is a fat emulsion prepared for intravenous administration as source of calories and essentially fatty acids, made up of fish oil (10%), glycerin (2.5%) and egg phospholipids (1.2%). Its total caloric value is 1.12 kcal/mL. *Omegaven*<sup>®</sup> fatty acid's nature is identical to that of *Intralipid*<sup>®</sup>, but their concentrations are different, which modifies the omega-3/omega-6 (n-3/n-6) ratio. In a second step, the TPN preparation generating the lowest amount of 4-HNE was compared to the control (MVP-AA+Light) in its ability to induce *in vivo* oxidative stress and TNF-□□ and IL-1 mRNA.

*In vivo* protocol:

Three-day-old guinea pig pups (N = 13) (Charles River, St-Constant, QC, Canada) were infused during 4 days *via* a catheter secured in their right jugular, with TPN solutions as previously described (8,20). TPN were administered as a binary mode, with lipid emulsion (1.5% (w,v)) separated from the other components (1% (v,v) MVP / 2.2% (w,v) amino acid / 8.7% (w,v) dextrose). Half of the animals received TPN in which the lipid emulsion was *Intralipid20%*<sup>®</sup> whereas for the other half, the lipid emulsion was *Omegaven*<sup>®</sup> (adjusted to deliver identical amounts of fat compared to *Intralipid20%*<sup>®</sup>). TPN solutions were infused continuously at a rate of 22 mL/100 g body weight/d (animals receiving 0.48 g/100 g/d of amino acids and 0.33 g/100 g/d of lipids), and were changed daily. After 4 days, animals were sacrificed to collect the liver, which was immediately minced and separated in several aliquots. One was immediately treated for glutathione determinations whereas the other aliquots were frozen at -80°C until biochemical determinations. Guinea pigs were housed in an animal facility on a 12hr light/dark cycle and constant temperature. The study was approved by the Institutional Review Board for the care and handling of animals, in accordance with guidelines of the Canadian Council of Animal Care.

*Determinations*

Glutathione: Half a gram of liver was homogenized on ice (polytron, 20 sec) after adding 2.5 mL of 5% (w/v) freshly prepared metaphosphoric acid, and centrifuged for 3 min at 7,800 x g. Supernatant containing glutathione and pellet containing total protein were immediately frozen until glutathione determination and total protein measurement. Reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione were separated by capillary electrophoresis (75  $\mu\text{m}$   $\times$  50 cm silica; 75 mM boric acid + 25 mM Bis-Tris, pH 8.4, 28°C, 18 kV), detected at

200 nm on a P/ACE MDQ system (Beckman Coulter) and quantified using external standard curves (8). The half-cell reduction potential of the GSSG/2GSH couple, or redox potential ( $E_{hc}$ ), was determined using the Nernst equation ( $E_{hc} = -240 - (59.1/2) \cdot \log([GSH]^2/[GSSG])$  mV, at 25°C, pH 7.0).

F<sub>2α</sub>-isoprostanes: Hepatic levels were quantified using a commercial enzyme immunoassay kit according to the protocol recommended by the company (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Levels are expressed in fmol/mg protein.

Peroxide: Ferrous-oxidation xylenol orange (FOX) assay was used for determination of hydroperoxide (8) concentrations by using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a standard curve.

Glutathionyl 1,4-dihydroxynonenal and glutathionyl 1,4-dihydroxyhexenal: *In vivo* 4-HNE and 4-HHE are detoxified by the glutathione-S-transferase to form respectively glutathionyl 1,4-dihydroxynonenal (GS-HNE) (21) and glutathionyl 1,4-dihydroxyhexenal adduct (GS-HHE) (22). Hence, 4-HNE and 4-HHE concentrations have been determined in TPN solutions whereas *in vivo* hepatic GS-HNE and GSHHE levels have been measured by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LC-MS) using reverse phase Eclipse Plus C18 column coupled with Agilent 1100 single quadrupole. The approach used is similar to what has been previously published for HNE-protein adducts (23), allowing a differentiation of the aldehyde from the alcohol form by reduction with 1M NaB<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, generating stable [<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]DHN, and has been described in our previous study. Briefly, *in vitro* levels of hydroxyalkenals were directly quantified as dihydroxynonene (DHN) and dihydroxyhexene (DHH) after their reduction by NaBH<sub>4</sub> by LC-MS, using internal standard [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]DHN. Operating parameters were a cone voltage of 60V, source block temperature of 350°C, and nitrogen nebuliser gas flow at 12 L/min. Acquisition time

was between 8 and 18 min for  $m/z = 116, 158$  and  $162$  for DHH, DHN and  $[2H_4]DHN$  respectively. Results were expressed as  $\mu M$  of 4-HNE or 4-HHE. *In vivo* quantification was performed after the homogenization of 0.5g of liver in cold buffer (HEPES 39mM, EDTA 0.4mM, BHT 0.9mM, pH 7.4),  $NaB_2H_4$  treatment, and protein precipitation by saturated sulfosalicylic acid. With identical operating parameters, measurements of  $m/z = 425, 467$  and  $470$  for glutathionyl 1,4-dihydroxyhexene GS- $[2H]DHH$ , glutathionyl 1,4-dihydroxynonene GS- $[2H]DHN$  and internal standard GS- $[2H_4]DHN$  respectively, allowed quantitation in the supernatant. Results were expressed as pmol GS-HNE or GS-HHE/mg protein.

mRNA levels of TNF- $\alpha$  and IL-1: Total RNA was isolated from liver as followed. One hundred mg of liver were homogenized in 1 mL Trizol. Subsequently, after addition of 200  $\mu L$  chloroform, samples were centrifuged at  $31,200 \times g$  for 15 min at  $4^\circ C$ . The mRNA supernatant was collected, precipitated in isopropanol (500  $\mu L$ ) for 10 min. After 10 min centrifugation at  $31,200 \times g$  at  $4^\circ C$ , pellet was washed with 500  $\mu L$  70% ethanol and centrifuged as above. The pellet was air dried ( $37^\circ C$ , 1 hr) and resuspended in RNase free water until solubilisation. Sample RNA concentration was determined by reading absorbance at 260 nm, and the ratio of absorbances read at 260/280 nm was used as indicator of RNA purity. The cDNA synthesis followed the company protocol, using 100 ng that were reversetranscribed by using Quantitect Reverse transcription Kit (Qiagen). SYBR green I labeling method was used to quantify mRNA by real-time (Stratagene Mx 3000P™). Primers were designed using *Primer3 Input* software, and are presented in the Table 1. The cycles performed for amplification consisting on a first denaturation at  $95^\circ C$  for 5 min followed by 40 cycles of annealing/extension ( $95^\circ C$ -10 sec,  $64^\circ C$ -30 sec).

According to the method described by Livak & Schmittgen (24), mRNA levels of targeted genes were reported as  $\Delta$ CT values (cycle number at which PCR target plots cross the threshold, normalized to the levels expression of 18S rRNA), and converted to relative expression  $2^{-\Delta\Delta CT}$  where  $\Delta$ CT values of target genes are normalized to a control value.

Fatty acids determination: One hundred  $\mu$ l of the TPN solutions mixed with 2.2 mL of organic mixture (containing 2 mL hexane:methanol (1:4), 0.004 % (w/v) BHT, 200  $\mu$ L acetyl chloride, 14.95  $\mu$ g of the internal standard nonadenenoic acid) were incubated during 1 hr with agitation at 100°C. Five ml of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 6% (w/v) were added and the mixed solution was centrifuged during 5 min at 740 x g. One  $\mu$ L of the upper phase was injected into a Varian CP-3800 GC with flame ionization detector (FID), using a column factor Four Varian CP913626 (90m x 0.32mm).

#### *Statistical analysis*

Data (mean  $\pm$ sem) were orthogonally compared by ANOVA after verification of the homoscedasticity by the Bartlett's  $\chi^2$ . The threshold of significance was set at  $p < 0.05$ . Statistical analyses of TNF- $\alpha$  and IL-1 mRNA levels were achieved with  $\Delta$ CT values, and are graphically represented as relative expression  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

## **RESULTS**

The Figures 1 and 2 show the impact of the modes of TPN on the quality of fatty acids. The concentrations of mono- (MUFAs) and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (Figure 1) were lower in MVP-LIP exposed to light ( $F_{(1,9)} > 7.3$ ,  $p < 0.05$ ), independently of the lipid emulsion used, whereas the beneficial effect of photo-protection of MVP-AA was observed

only with TPN compounding with *Omegaven*<sup>®</sup>, in which MUFAs and PUFAs were higher in light-protected TPN ( $F_{(1,9)} > 10.1$ ,  $p < 0.05$ ).

Similar results were observed for n-6 and n-3 fatty acids (Figure 2). In TPN performed with *Intralipid20%*<sup>®</sup>, the levels of n-3 ( $F_{(1,9)} = 7.6$ ,  $p < 0.05$ ) and n-6 fatty acids ( $F_{(1,9)} = 7.5$ ,  $p < 0.05$ ) were lower in MVP-LIP than in MVP-AA. There was no effect of light in the MVP-AA solutions ( $F_{(1,9)} < 1.2$ ). In TPN performed with *Omegaven*<sup>®</sup>, similarly to the situation with *Intralipid20%*<sup>®</sup>, levels of n-3 ( $F_{(1,9)} = 21.7$ ,  $p < 0.01$ ) and n-6 fatty acids ( $F_{(1,9)} = 18.8$ ,  $p < 0.01$ ) were lower in MVP-LIP than in MVPAA, with a significant effect of light protection. The concentrations of n-3 ( $F_{(1,9)} = 9.5$ ,  $p < 0.05$ ) and n-6 fatty acids ( $F_{(1,9)} = 13.1$ ,  $p < 0.01$ ) were higher in MVP-AA-Light.

Peroxidation of TPN leads to generation of peroxides and aldehydes (4-HNE and 4-HHE). Figure 3 demonstrates that the concentration of hydroperoxides was not influenced ( $F_{(1,18)} = 0.1$ ) by the lipid emulsion used (*Intralipid20%*<sup>®</sup> or *Omegaven*<sup>®</sup>) but by the light exposure and the admixture of MVP. The peroxide levels were greater in MVP-LIP ( $F_{(1,18)} = 95.2$ ,  $p < 0.01$ ) and lower in MVP-AA-Light ( $F_{(1,18)} = 29.0$ ,  $p < 0.01$ ). In contrast to peroxides, the concentrations of aldehydes varied greatly between TPN with *Intralipid20%*<sup>®</sup> and with *Omegaven*<sup>®</sup> (Figure 4); levels of 4-HNE and 4-HHE have been analyzed separately. Similarly to peroxide levels, both aldehyde concentrations were higher in MVPLIP ( $F_{(1,9)} > 28.4$ ,  $p < 0.01$ ) and lower in MVP-AA-Light ( $F_{(1,9)} > 9.2$ ,  $p < 0.05$ ) compared to MVPAA+Light. The observation of differential generation of aldehydes between TPN has led us to calculate a fatty acids oxidative (FAO) index in order to evaluate which solution has the highest susceptibility to peroxidation. Because free aldehydes react rapidly with several amino acids (histidine, lysine, cysteine) present in TPN and that these HNE-amino acids



were not quantified, this index should not be considered as an exact measurement of the susceptibility to the oxidation of each n-series fatty acid, but as an index to evaluate which TPN solutions has the highest susceptibility to peroxidation. The FAO index is expressed as the number of substrate molecules needed to generate one molecule of aldehyde (concentration of n-3 or n-6 fatty acids divided by concentration of 4-HHE or 4-HNE in TPN solutions). Higher is this index, more resistant is the emulsion to peroxidation. Data presented in the table 2 show that n-6 fatty acids are more resistant than n-3 fatty acids ( $F_{(1,9)} = 6.7$ ,  $p < 0.05$ ); resistance to peroxidation is higher (i) in TPN including *Intralipid20%*<sup>®</sup> rather than *Omegaven*<sup>®</sup> ( $F_{(1,9)} = 8.9$ ,  $p < 0.05$ ), (ii) in MVP added to AA rather than to LIP ( $F_{(1,9)} = 13.2$ ,  $p < 0.05$ ), and (iii) with light protection compared to light exposition ( $F_{(1,9)} = 11.5$ ,  $p < 0.05$ ).

The figure 4 shows that the best option to limit the formation of 4-HNE in TPN was to use *Omegaven*<sup>®</sup> as source of lipid emulsion. Therefore, the impact of TPN containing different levels of 4-HNE has been evaluated in an animal model by comparing those infused with MVP-AA+Light compounded with *Intralipid20%*<sup>®</sup>, the standard used in North America that generated  $1.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$  4-HNE, to MVPAA+ Light compounded with *Omegaven*<sup>®</sup>, which produced  $0.22 \pm 0.01 \mu\text{M}$  4-HNE. In those solutions, the levels of HHE were respectively  $1.8 \pm 0.1$  and  $12.2 \pm 0.7 \mu\text{M}$ , whereas their concentrations in peroxides were not different (Figure 3). After four days on continuous infusion, markers of oxidative stress, levels of GS-HNE and GS-HHE as well as TNF- $\alpha$  and IL-1 mRNA were measured in the liver.

The redox potential (Table 3) was higher (more oxidized) in TPN with *Intralipid20%*<sup>®</sup> ( $F_{(1,9)} = 24.4$ ,  $p < 0.01$ ) than with *Omegaven*<sup>®</sup>. This difference can be related to higher levels of GSSG ( $F_{(1,9)} = 15.0$ ,  $p < 0.01$ ) without significant changes of the GSH ( $F_{(1,9)} = 3.9$ ). GS-HNE level (Figure 5) was higher in liver from animal infused with TPN including *Intralipid20%*<sup>®</sup> than TPN with *Omegaven*<sup>®</sup> ( $F_{(1,9)} = 9.3$ ,  $p < 0.05$ ) There was no significant difference in hepatic levels of  $F_{2\alpha}$ -isoprostanes ( $F_{(1,11)} = 3.9$ ) and GSHHE ( $F_{(1,11)} = 2.5$ ). Animals infused with TPN + *Omegaven*<sup>®</sup> (Figure 5) had lower mRNA level of TNF- $\alpha$  ( $F_{(1,9)} = 9.8$ ,  $p < 0.05$ ) and IL-1 ( $F_{(1,9)} = 23.5$ ,  $p < 0.01$ ) than those infused with TPN + *Intralipid20%*<sup>®</sup>.

## DISCUSSION

Different alternatives are proposed to reduce oxidative stress induced by the actual mode of TPN administration (MVP-AA+Light). The first and more difficult to routinely apply in clinical situation is the photo-protection of the intravenous solution, which needs to be always protected, since its formulation in pharmacy to its administration at the bedside. A second approach deriving from recommendations of the European Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition Metabolism (14) is the addition of MVP to the lipid emulsion. Since we suspected biological adverse effects on liver of a specific metabolite of TPN oxidation, namely 4-HNE that derives from n-6 fatty acid peroxidation, we proposed also to test a situation in which the lipid emulsion containing a high level of n-6 fatty acids (*Intralipid20%*<sup>®</sup>) was replaced by an emulsion enriched in n-3 fatty acids (*Omegaven*<sup>®</sup>).

Surprisingly, MVP-LIP and light protection had opposite effects on the quality of fatty acids in TPN as well as on generation of peroxides and aldehydes independently of the ratio of n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids in the lipid emulsions. As expected, photo protection reduced the oxidation of TPN components, but the addition of MVP to lipid emulsion promoted peroxidation. The recommendations of the European Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition Metabolism (14) are based on study showing a reduction in levels of peroxides in lipid emulsion containing MVP (25). However, during the lipid peroxidation process, an electron is lost from unsaturated bound of fatty acid generating lipid free radical, converted into hydroperoxide and finally aldehyde such as 4-HNE or 4-HHE. Hence, in the study of Silvers *et al* (25), the lower triacylglyceryl peroxide levels measured in TPN in which MVP was added to lipid emulsion possibly reflect their fragmentation into aldehydes. Lipid emulsion has been reported as a good substrate in production of peroxides catalyzed by riboflavin present in MVP (5). A first conclusion of the results presented here is that the addition of MVP in lipid emulsion is not a valuable mode of TPN to reduce generation of peroxides and aldehydes. Although of the difficulty of carrying out, photo protection remains the best solution. The levels of aldehydes generated in intravenous solutions differ according to the type of lipid emulsion used for the TPN compounding. Interestingly, TPN with *Omegaven*<sup>®</sup> is more sensitive to peroxidation, producing more aldehydes per fatty acids than TPN with *Intralipid20%*<sup>®</sup>. This observation is in accordance with others suggesting that long chain n-3 polyunsaturated fatty acids can be more prone to peroxidation than the n-6 series (26). This is also consistent with the observation of the impact of light exposure on the levels of n-3 and n-6 fatty acids that was observed only with TPN compounding with *Omegaven*<sup>®</sup>.

Despite the potential high ability of *Omegaven*<sup>®</sup> for peroxidation, the generation of 4-HNE in TPN remains 5 times lower than the levels measured with *Intralipid20%*<sup>®</sup>, which is explained by a lower n-6 substrate concentration. Since this aldehyde is suspected to be involved in TPN-related liver diseases, the *in vivo* impact of a 4 day infusion of TPN containing either *Omegaven*<sup>®</sup> or *Intralipid20%*<sup>®</sup> has been compared. We could have chosen to compare the TPN solution generating the highest concentrations of 4-HNE (MVP-LIP (*Intralipid20%*<sup>®</sup>)) to the lowest levels (MVP-AA-Light (*Omegaven*<sup>®</sup>)), but our choice has been directly related to the clinical situation by comparing the type of lipid emulsion within the same mode of TPN administration. The infusion of TPN compounding with *Omegaven*<sup>®</sup>, compared to the one with *Intralipid20%*<sup>®</sup>, induced lower hepatic redox potential (Table 3) and gene transcription levels of two pro-inflammatory cytokines, namely IL-1 and TNF- $\alpha$ . The redox potential of glutathione measured in liver from animals infused with TPN + *Omegaven*<sup>®</sup> is comparable to values reported for animals the same age without any manipulation (27,49), suggesting an absence of oxidative stress although the presence of peroxides in the TPN solution. This absence of oxidative stress associated with peroxides infused with TPN in liver has been previously reported (20). Because the difference in redox potential is related to the GSSG level (Table 3), results suggest that other metabolites from TPN + *Intralipid20%*<sup>®</sup> favor the oxidation of GSH. The absence of significant difference in the levels of F<sub>2</sub> $\alpha$ -isoprostanes cannot be interpreted as an absence of effect since the statistical power was too low ( $1-\beta = 18\%$ ).

Hence, the lower mRNA levels of IL-1 and TNF- $\alpha$  in animal infused with TPN containing *Omegaven*<sup>®</sup>, which is consistent with reports on anti-inflammatory effect of n-3 fatty acids

(19), can be explained by lower 4-HNE quantities infused compared to *Intralipid20%*<sup>®</sup>. A previous report using the same TPN animal model suggested that the infused 4-HNE activated NFκB (28), a well-known pathway leading to gene transcription of pro-inflammatory cytokines (29), independently of oxidative stress induced by TPN. However, even if its hepatic concentration increased as indicated by GS-HHE, 4-HHE appears to be without effect, whereas it is cited to also activate the NFκB pathway (15). Several studies have reported that n-3 peroxidation, especially of docosahexaenoic acid (DHA), leads to the generation of eicosanoid structural analogs called neuroprostane, described as potent inhibitors of NFκB signaling that may contribute to anti-inflammatory actions (30). Further investigations are needed to clearly discriminate 4-HNE, 4-HHE and n-3 neuroprostane effects. Production of hepatic pro-inflammatory markers is often cited as part of hepatic disease associated with TPN such as intra-hepatic cholestasis (7). The present study suggests that 4-HNE can be a contributing agent in this process. Our findings demonstrate that the photo-protection remains the best issue to reduce both peroxide and aldehyde production in TPN solutions. However, a valuable alternative to the complexity of an adequate photo-protection is the use of a lipid emulsion containing a low concentration of n-6 fatty acids, such as *Omegaven*<sup>®</sup>, rather than other enriched in n-6 fatty acids, for instance *Intralipid20%*<sup>®</sup> to allow a reduction of infused 4-HNE but not peroxides. A supplemental beneficial effect of using *Omegaven*<sup>®</sup> was the absence of apparent oxidative stress in liver. An adjusted mixture of n-6 and n-3 fatty acids can be a better nutritive option. However, generation of 4-HNE from n-6 fatty acids of this TPN solution will remain questionable. Further studies should investigate the optimal ratio n-3/n-6 fatty

acids in lipid emulsion in order to provide adequate lipid calories, essential lipids and limit the 4-HNE generation under efficient biological concentration.

**ACKNOWLEDGMENTS:** This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (MOP 77637).

The authors declare no conflict of interest.

**Contribution(s) of each author:**

Khalil Miloudi: participation in experiment design, biological specimen collection, generation of data except fatty acids, data analysis and participation in the writing of the manuscript;

Blandine Comte: advice in oxidative stress, contribution in data interpretation and significant participation in the writing;

Thérèse Rouleau: specific expertise with the animal model;

Alain Montoudis: fatty acid determinations;

Emile Levy: significant expertise in lipids;

Jean-Claude Lavoie: experiment design, data analysis and writing of the manuscript.

## REFERENCES

- 1 Puder M. Infant parenteral nutrition-associated cholestasis: a severe iatrogenic disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2010; 34: 94-95.
- 2 Lavoie J C, Belanger S, Spalinger M, Chessex P. Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition: the major contributor to in vitro generation of peroxides. *Pediatrics* 1997; 99:E6.
- 3 Laborie S, Lavoie J C, Pineault M Chessex P. Contribution of multivitamins, air, and light in the generation of peroxides in adult and neonatal parenteral nutrition solutions. *Ann Pharmacother* 2000; 34: 440-445.
- 4 Pitkanen O, Hallman M, Andersson S. Generation of free radicals in lipid emulsion used in parenteral nutrition. *Pediatr Res* 1991; 29: 56-59.
- 5 Laborie S, Lavoie J C, Chessex P. Paradoxical role of ascorbic acid and riboflavin in solutions of total parenteral nutrition: implication in photoinduced peroxide generation. *Pediatr Res* 1998; 43: 601-606.
- 6 Plebani M, Panozzo M P, Basso D, De Paoli M, Biasin R, Infantolino D. Cytokines and the progression of liver damage in experimental bile duct ligation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26: 358-363.
- 7 Donner M G, Schumacher S, Warskulat U, Heinemann J, Häussinger D. Obstructive cholestasis induces TNF-alpha- and IL-1 -mediated periportal downregulation of Bsep and zonal regulation of Ntcp, Oatp1a4, and Oatp1b2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G1134-1146.

- 8 Lavoie J C, Chessex P, Gauthier C, Levy E, Alvarez F, St-Louis P, Rouleau T. Reduced bile flow associated with parenteral nutrition is independent of oxidant load and parenteral multivitamins. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41: 108-114.
- 9 Esterbauer H, Schaur R J, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11: 81-128.
- 10 Uchida K, Szweda L I, Chae H Z, Stadtman E R. Immunochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in oxidized hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 8742-8746.
- 11 Guichardant M, Taibi-Tronche P, Fay L B, Lagarde M. Covalent modifications of aminophospholipids by 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 1049-1056.
- 12 Kowalczyk P, Ciesla J M, Komisarski M, Kusmierk J T, Tudek B. Long-chain adducts of trans-4-hydroxy-2-nonenal to DNA bases cause recombination, base substitutions and frameshift mutations in M13 phage. *Mutat Res* 2004; 550: 33-48.
- 13 Paradis V, Kollinger M, Fabre M, Holstege A, Poynard T, Bedossa P. In situ detection of lipid peroxidation by-products in chronic liver diseases. *Hepatology* 1997; 26: 135-142.
- 14 Koletzko B, Goulet O, Hunt J, Krohn K, Shamir R. 1. Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR). *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41: S1-87.
- 15 Long E K, Picklo M J, Sr. Trans-4-hydroxy-2-hexenal, a product of n-3 fatty acid peroxidation: make some room HNE. *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 1-8.



- 16 Winter C K, Segall H J, Haddon W F. Formation of cyclic adducts of deoxyguanosine with the aldehydes trans-4-hydroxy-2-hexenal and trans-4-hydroxy-2-nonenal in vitro. *Cancer Res* 1986; 46: 5682-5686.
- 17 Bacot S, Bernoud-Hubac N, Baddas N, Chantegrel B, Deshayes C, Doutheau A, Iagrade M, Guichardant M. Covalent binding of hydroxy-alkenals 4-HDDE, 4-HHE, and 4-HNE to ethanolamine phospholipid subclasses. *J Lipid Res* 2003; 44: 917-926.
- 18 Cotogni P, Muzio G, Trombetta A, Ranieri V M, Canuto R A. Impact of the omega-3 to omega-6 polyunsaturated fatty acid ratio on cytokine release in human alveolar cells. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2011; 35: 114-121.
- 19 Hao W, Wong O Y, Liu X, Lee P, Chen Y, Wong K K.  $\omega$ -3 fatty acids suppress inflammatory cytokine production by macrophages and hepatocytes. *J Pediatr Surg* 2010; 45: 2412-2418.
- 20 Chessex P, Lavoie J C, Laborie S, Rouleau T. Parenteral multivitamin supplementation induces both oxidant and antioxidant responses in the liver of newborn guinea pigs. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 32: 316-321.
- 21 Alary J, Gueraud F, Cravedi J P. Fate of 4-hydroxynonenal in vivo: disposition and metabolic pathways. *Mol Aspects Med* 2003; 24: 177-187.
- 22 Winter C K, Segall H J, Jones A D. Distribution of trans-4-hydroxy-2-hexenal and tandem mass spectrometric detection of its urinary mercapturic acid in the rat. *Drug Metab Dispos* 1987; 15: 608-612.
- 23 Veronneau M, Comte B, Des Rosiers C. Quantitative gas chromatographic-mass spectrometric assay of 4-hydroxynonenal bound to thiol proteins in ischemic/reperfused rat hearts. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1380-1388.

- 24 Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$  Method. *Methods* 2001; 25: 402-408.
- 25 Silvers K M, Sluis K B, Darlow B A, McGill F, Stocker R, Winterbourn C C. Limiting light-induced lipid peroxidation and vitamin loss in infant parenteral nutrition by adding multivitamin preparations to Intralipid. *Acta Paediatr* 2001; 90: 242-249.
- 26 Michalski M C, Calzada C, Makino A, Michaud S, Guichardant M. Oxidation products of polyunsaturated fatty acids in infant formulas compared to human milk--a preliminary study. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52: 1478-1485.
- 27 Turcot V, Rouleau T, Tsopmo A, Germain N, Potvin L, Nuyt A M, Lavoie J C. Long-term impact of an antioxidant-deficient neonatal diet on lipid and glucose metabolism. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 275-282.
- 28 Miloudi K, Comte B, Rouleau T, Lavoie J C. Hepatic inflammatory response to parenteral nutrition in newborn guinea pig. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2011; in revision
- 29 Ruef J, Moser M, Bode C, Kübler W, Runge M S. 4-hydroxynonenal induces apoptosis, NF $\kappa$ B- activation and formation of 8-isoprostane in vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol* 2001; 96: 143-150.
- 30 Musiek ES, Brooks JD, Joo M *et al* (2008) Electrophilic cyclopentenone neuroprostanes are anti-inflammatory mediators formed from the peroxidation of the omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *J Biol Chem* 283, 19927-19935.

## LEGENDS FOR FIGURES:

### **Figure 1: Mono- and polyunsaturated fatty acid concentrations in the different TPN preparations.**

MUFA: Monounsaturated fatty acid (panels A & B); PUFA: Polyunsaturated fatty acid (panels C & D); MV-AA-L: multivitamins (MV) mixed with hydrosoluble components (amino acids + dextrose (AA)) of light protected (-L) TPN; MV-AA+L: MV mixed with AA of TPN without light protection (+L); MV-LIP+L: MV mixed with lipid emulsion (LIP) of TPN without light protected (+L). The lipid emulsion used for TPN was *Intralipid20%*<sup>®</sup> (panels A & C) or *Omegaven*<sup>®</sup> (panels B & D). With *Intralipid20%*<sup>®</sup>, MUFA and PUFA were lower in MV-LIP+L ( $p < 0.05$ ) compared to [MV-AA+L & MV-AA-L] whereas the light protection of MV-AA was without significant effect. With *Omegaven*<sup>®</sup>, MUFA and PUFA were lower in MV-LIP+L ( $p < 0.05$ ) and higher in MV-AA-L ( $p < 0.01$ ), compared to MV-AA+L. Mean  $\pm$  sem,  $n = 4$ ; \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ .

### **Figure 2: Concentrations of n-3 and n-6 fatty acids in the different TPN preparations.**

MV-AA-L: multivitamins (MV) mixed with hydrosoluble components (amino acids + dextrose (AA)) of light protected (-L) TPN; MV-AA+L: MV mixed with AA of TPN without light protection (+L); MV-LIP+L: MV mixed with lipid emulsion (LIP) of TPN without light protected (+L). The lipid emulsion used for TPN was *Intralipid20%*<sup>®</sup> (panels A & C) or *Omegaven*<sup>®</sup> (panels B & D). With *Intralipid20%*<sup>®</sup>, n-6 (omega-6) (panel A) and n-3 (omega-3) fatty acid levels (panel C) were lower in MV-LIP+L ( $p < 0.05$ ) compared to [MV-AA+L & MV-AA-L] whereas the light protection of MV-AA was without significant

effect. With *Omegaven*<sup>®</sup>, n-6 (panel B) and n-3 fatty acid levels (panel D) were lower in MV-LIP+L ( $p<0.05$ ) and higher in MV-AA-L ( $p<0.01$ ). Mean  $\pm$  sem, n= 4; \*:  $p<0.05$ ; \*\*:  $p<0.01$ .

**Figure 3: Concentrations of hydroperoxides in the different TPN preparations.**

MV-AA-L: multivitamins (MV) mixed with hydrosoluble components (amino acids + dextrose (AA)) of light protected (-L) TPN; MV-AA+L: MV mixed with AA of TPN without light protection (+L); MV-LIP+L: MV mixed with lipid emulsion (LIP) of TPN without light protected (+L). The lipid emulsion used for TPN was *Intralipid20%*<sup>®</sup> or *Omegaven*<sup>®</sup>. The hydroperoxide levels in TPN were higher ( $p<0.01$ ) in MV-LIP+L compared to [MV-AA+L & MV-AA-L], and lower ( $p<0.01$ ) in photoprotected TPN (MV-AA-L). There was no statistical difference between TPN compounding with *Intralipid20%*<sup>®</sup> or *Omegaven*<sup>®</sup>. Mean  $\pm$  sem, n= 4; \*\*:  $p<0.01$ .

**Figure 4: Concentrations of 4-hydroxynonenal and 4-hydroxyhexanal in the different TPN preparations.**

MV-AA-L: multivitamins (MV) mixed with hydrosoluble components (amino acids + dextrose (AA)) of light protected (-L) TPN; MV-AA+L: MV mixed with AA of TPN without light protection (+L); MV-LIP+L: MV mixed with lipid emulsion (LIP) of TPN without light protected (+L). The lipid emulsion used for TPN was *Intralipid20%*<sup>®</sup> (panels A & C) or *Omegaven*<sup>®</sup> (panels B & D). With *Intralipid20%*<sup>®</sup> and with *Omegaven*<sup>®</sup>, concentrations of both aldehydes (4-hydroxynonenal (panels A & B) and 4-hydroxyhexanal

(panels C & D)) in TPN was higher ( $p < 0.01$ ) in MV-LIP+L compared to [MV-AA+L & MV-AA-L], and lower ( $p < 0.05$ ) in photo-protected TPN (MV-AA-L). Mean  $\pm$  sem,  $n = 4$ ; \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ .

**Figure 5: Hepatic levels of GS-HNE, GS-HHE, mRNA of TNF- $\alpha$  and of IL-1 in animals infused with TPN compounding with *Intralipid20%*® or with *Omegaven*®.**

TPN = MV-AA+L: multivitamins (MV) mixed with hydrosoluble components (amino acids + dextrose (AA)) of TPN without light protection (+L). Lipid emulsion (1.5 % (w,v)) included in TPN was *Intralipid20%*® or *Omegaven*®. GS-HNE: 4-hydroxynonenal conjugated with glutathione; GS-HHE: 4- hydroxyhexenal conjugated with glutathione. The hepatic level of GS-HNE was lower ( $p < 0.05$ ) in animal infused with TPN compounding with *Omegaven*® rather than with *Intralipid20%*® (panel A) whereas GS-HHE levels did not differ between groups (panel B). The mRNA hepatic levels of both TNF- $\alpha$  (panel C) and IL-1 (panel D) were lower ( $p < 0.05$ ) in animals infused with TPN containing *Omegaven*®. Mean  $\pm$  sem,  $n = 6-7$ ; \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ .

**Table 1. 5'-3' Sequences of primers used for TNF- $\alpha$ , IL-1 and 18S**

	<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	ATCTACCTGGGAGGCGTCTT	GAGTGGCACAAGGAACTGGT
<b>IL-1</b>	TGTGAAATGCCACCTTTTGA	GTAGCTGCCACAGCTTCTCC
<b>18S</b>	TGCATGGCCGTTCTTAGTTG	AGTTAGCATGCCAGAGTCTCGTT

Sequences of primers used for TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-8 and housekeeping gene 18S were designed by using *Primer3 Input* software.

**Table 2. Fatty acids oxidation (FAO) index of TPN**

	<b>MV-AA -L</b>	<b>MV-AA +L</b>	<b>MV-LIP +L</b>
	<i><b>Intralipid20%®</b></i>	<i><b>Intralipid20%®</b></i>	<i><b>Intralipid20%®</b></i>
<b>FAO n-6</b>	109764 ± 17265	37830 ± 9922 **	17610 ± 2806 ††
<b>FAO n-3</b>	5442 ± 488	2823 ± 317 **	1171 ± 142 ††
	<b>MV-AA -L</b>	<b>MV-AA +L</b>	<b>MV-LIP +L</b>
	<i><b>Omegaven®</b></i>	<i><b>Omegaven®</b></i>	<i><b>Omegaven®</b></i>
<b>FAO n-6</b>	20506 ± 4860	6499 ± 624 **	3823 ± 277 ††
<b>FAO n-3</b>	3576 ± 835	962 ± 104 **	605 ± 17 ††

MV-AA-L: multivitamins (MV) mixed with hydrosoluble components (amino acids + dextrose (AA)) of light protected (-L) TPN; MV-AA+L: MV mixed with AA of TPN without light protection (+L); MV-LIP+L: MV mixed with lipid emulsion (LIP) of TPN without light protection (+L). The lipid emulsion used for TPN was *Intralipid20%®* or *Omegaven®*. FAO: Fatty acid oxidation index expressed as number of fatty acid (n-3 or n-6) molecules needed to generate 1 molecule of aldehyde. Higher is the FAO index, more resistant is the emulsion to peroxidation. FAO was higher 1) with n-6 fatty acids than n-3 series (p<0.01), 2) with TPN including *Intralipid20%®* than with *Omegaven®* (p<0.01), 3)

with MVP added to AA rather than to LIP ( $p < 0.01$ ) and 4) with light protection ( $p < 0.01$ ). Means  $\pm$  s.e.m,  $n = 4$ ; \*\*:  $p < 0.01$  between MV-AAL and MV-AA+L; ‡‡:  $p < 0.01$  between (MV-AA-L and MV-AA+L) and MV-LIP+L.

**Table 3. Hepatic glutathione and F<sub>2</sub> $\alpha$ -isoprostane levels**

	TPN ( <i>Intralipid20%</i> ®)	TPN
<b>(<i>Omegaven</i>®)</b>		
<b>GSH (nmol/mg prot)</b>	53.4 $\pm$ 6.3	72.4 $\pm$ 7.2
<b>GSSG (nmol/mg/prot)</b>	1.4 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.1 **
<b>Redox potential (mV)</b>	-209 $\pm$ 2	-231 $\pm$ 4 **
<b>F<sub>2</sub><math>\alpha</math>-isoprostanes (fmol/mg prot)</b>	35.6 $\pm$ 13.02	10.7 $\pm$ 4.94

Animals received intravenous light exposed total parenteral nutrition (TPN) (MV-AA+L) containing *Intralipid20%*® or *Omegaven*®. GSSG was lower and redox potential was more reduced in animal infused with TPN-*Omegaven*® compared to animals receiving TPN-*Intralipid20%*®. There was no statistical difference in GSH and F<sub>2</sub> $\alpha$ -isoprostane levels between groups. Means  $\pm$  s.e.m.,  $n = 6-7$ , \*\* $p < 0.01$ .



Figure 1

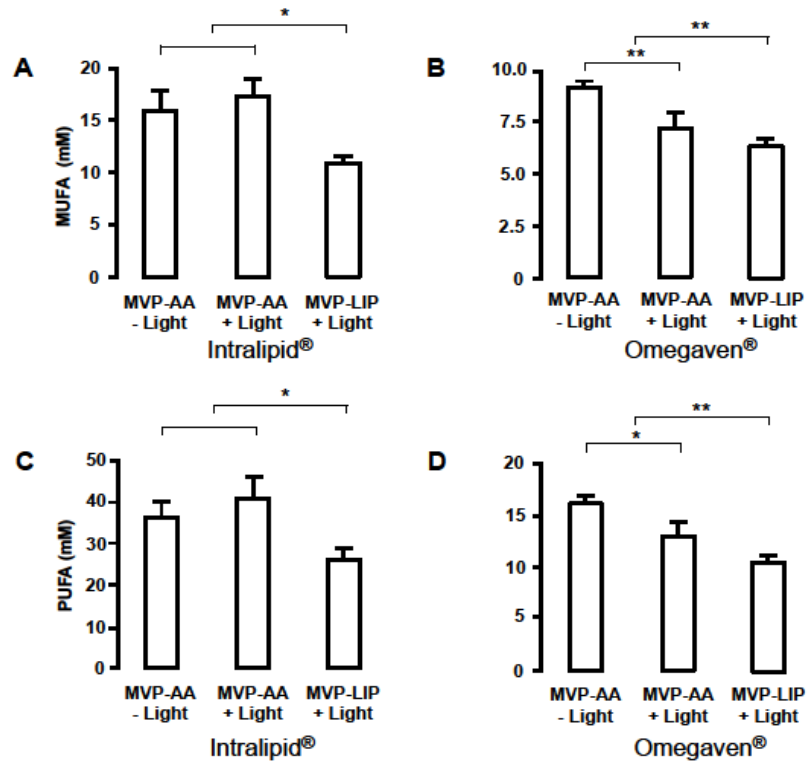


Figure 2

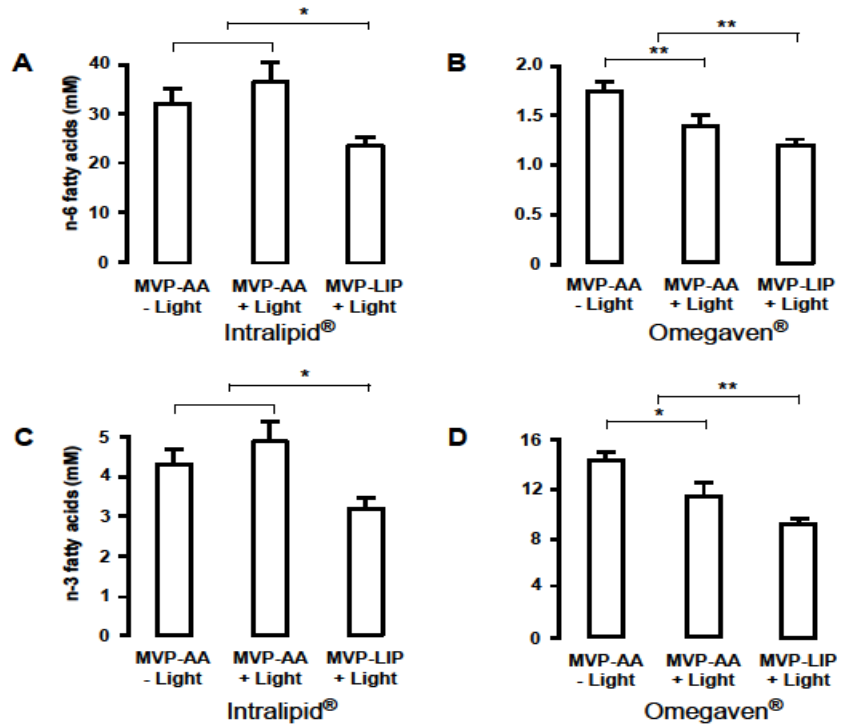


Figure 3  
Figure 3

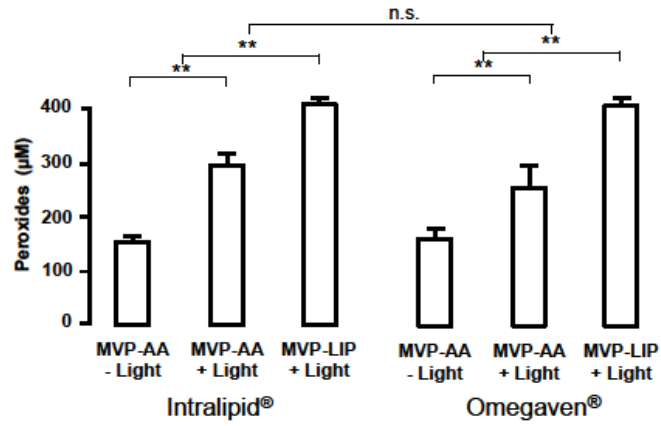


Figure 4  
Figure 4

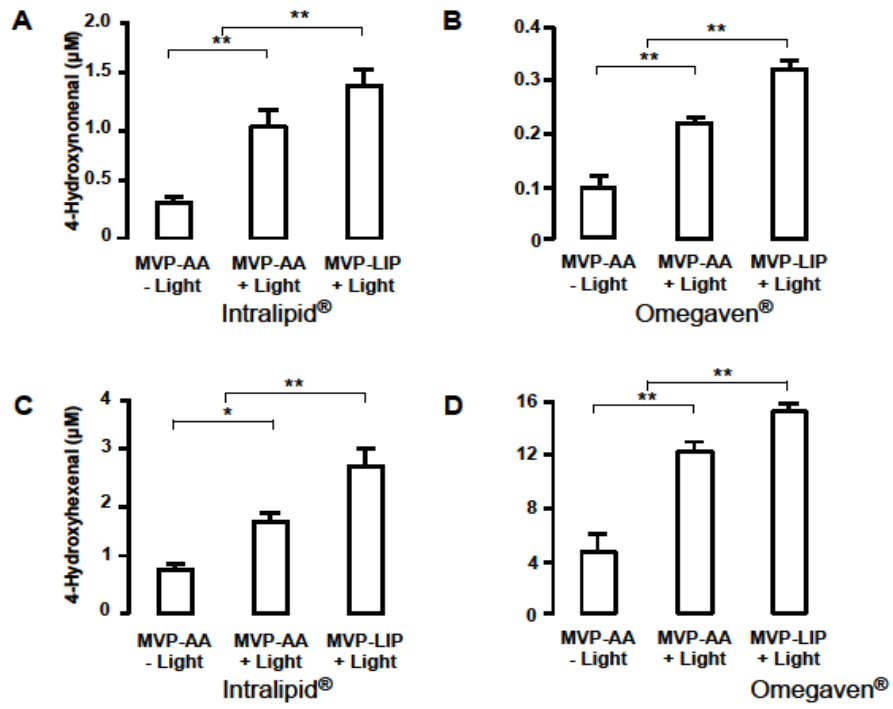
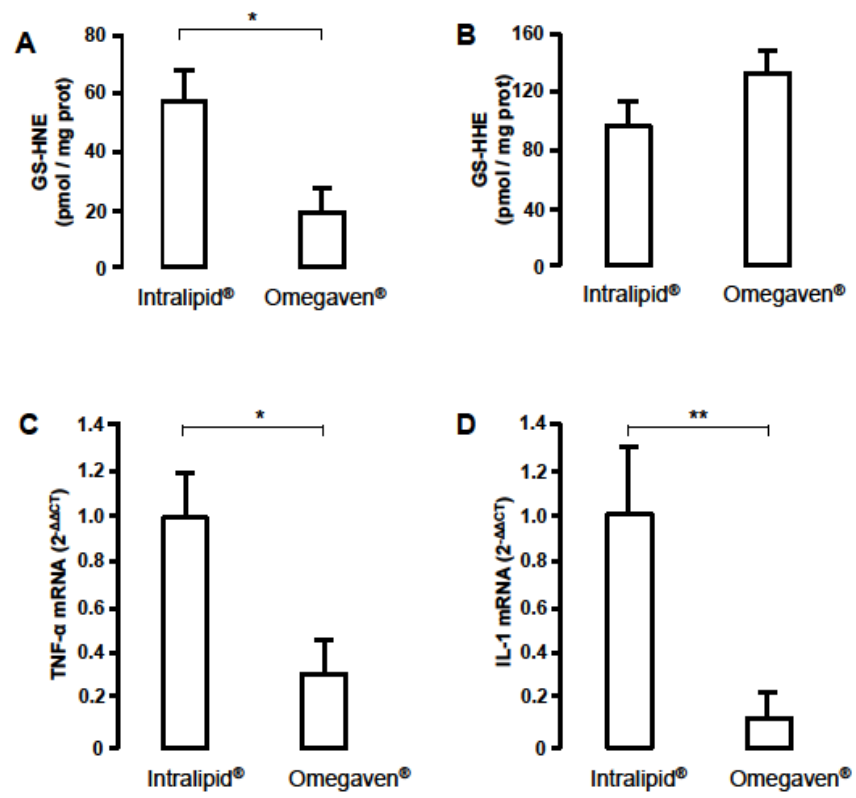


Figure 5

Figure 5





## ARTICLE 3

Article en révision dans *Pediatric Research*, 2011

### Hexapeptides from human milk prevent the induction of oxidative stress from parenteral nutrition in the newborn guinea pig.

Running title: **Prevention of oxidative stress from TPN**

Khalil Miloudi<sup>1</sup>, Apollinaire Tsopmo<sup>2</sup>, James K. Friel<sup>3</sup>, Thérèse Rouleau<sup>1</sup>, Blandine Comte<sup>4</sup>, and \*Jean-Claude Lavoie<sup>1</sup>.

*1* Department of Pediatrics [K.M., T.R., J.C.L.], University of Montreal, Montréal, QC, H3T 1C5, Canada; *2*Department of Chemistry [A.T.], Carleton University, Ottawa, ON, K1S 5B6, Canada; *3*Department of Human Nutritional Sciences and Paediatrics [J.K.F.], University of Manitoba, Winnipeg, MA, R3T 2N2, Canada; *4*Unité de Nutrition Humaine [B.C.], Université d'Auvergne, BP10448, F-63000 Clermont-Ferrand, INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

**Financial support:** This work was supported by a grant from the Advanced Foods and Materials Network (Project 11F) and Canadian Institutes for Health Research (MOP 77637).

**Category of manuscript:** Basic science

**Word count of abstract:** 200 words; **Word count of manuscript:** 4996 words.

**ABSTRACT**

In preterm neonates, peroxides contaminating total parenteral nutrition (TPN) contribute to oxidative stress, which is suspected to be a strong inducer of hepatic complications related to the prematurity. Recently, others reported that hexapeptides deriving from human milk exerted free radical scavenging activities *in vitro*. Therefore, the aim was to assess the capacity of these hexapeptides to limit the generation of peroxides in TPN and to prevent the TPN-induced hepatic oxidative stress. The addition of peptide-A (YGYTGA) into TPN allowed a reduction by half in peroxide contamination. In the guinea pig model of neonatal TPN on 4 days, peptide-A or peptide-B (ISELGW), added into TPN, corrected the hepatic oxidative status induced by TPN. Indeed, both peptides have lowered the hepatic redox potential of glutathione (more reduced) and the level of glutathionyl-1,4-dihydroxynonenal, a marker of lipid peroxidation. Compared to animals infused with TPN without peptide, the hepatic mRNA level of IL-1 and TNF $\alpha$  were lower in animals infused with TPN containing peptide-A or -B. These results suggest that the addition of YGYTGA or ISELGW into TPN will reduce oxidative stress in newborns. The reduction in mRNA of two pro-inflammatory cytokines could be important for the incidence of hepatic complications related to TPN.

## INTRODUCTION

Oxidative stress is present in very low birth weight preterm newborn (1) and is suspected to play a key role in several complications of prematurity. Although the contribution of oxygen supplementation is recognized (1), total parenteral nutrition (TPN) is also an important source of oxidants. Peroxides in TPN derive mainly from the reduction of dissolved oxygen by electron donors such as vitamin C, amino acids and lipids (2). These reactions are catalyzed by ambient light through photo-sensitive riboflavin (2). Complete photo-protection reduced by half the generation of peroxides (1), but is not practical in the neonatal unit. During reactions occurring in TPN several reactive components are produced including hydrogen peroxide (3), lipid hydroperoxides (4) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) (5).

*In vivo*, 4-HNE is detoxified by conjugation with glutathione (6). Preterm infants who have immature antioxidant system (7), and low glutathione (8) are at risk to develop several pathological complications such as bronchopulmonary dysplasia, retinopathy of prematurity and hepatocellular injury (9-11). Therefore, reactive molecules such as 4-HNE can interfere with proteins (12), lipids (13) and DNA (14), disrupt the cellular redox balance (15), act on cell signaling and induce inflammatory response by activating the NF $\kappa$ B pathway (16).

It is well known that human milk (HM) promotes antioxidant capacity in the newborn compared to artificial milk (AM) (17). This property is associated with a greater free radical scavenging capacity (18, 19). However, at the time when very low birth weight premature newborns are nourished with TPN, their gastrointestinal track is too immature to receive significant amounts of HM. Recently, Tsopmo *et al* (20) isolated two hexapeptides

from enzymatic hydrolysates of HM having a high free radical scavenging capacity *in vitro* (20). We hypothesized that the addition of those peptides into TPN could be a valuable alternative to light protection. Therefore, the aims of this study were to assess the scavenging capacity of these peptides in the prevention of oxidation of TPN components test the ability of peptides added in TPN to 1) reduce the hepatic level of oxidative stress markers, especially 4-HNE, and 2) to prevent induction of two pro-inflammatory cytokines: Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and Interleukin-1 (IL-1). To assess the impacts of these peptides derived from HM, of the animals were nourished or not with human milk in order to generate reference values.



## MATERIALS AND METHODS

### *Experimental designs*

#### **Experiment 1:** To test the peptides' capacity to prevent generation of peroxides in TPN.

Peptides-A (YGYTGA) and -B (ISELGW) were previously identified as described in human milk (20). The peptides (95% purity) were synthesized by GenWay Biotech Inc. (San Diego, California, USA). TPN solutions were prepared with 0, 10, 20, or 40 mM peptide-A or peptide-B (peptides were added first) + 2.2% (w/v) amino acids (Travasol<sup>®</sup>, Baxter, Mississauga, ON, Canada) + 8.7% dextrose + 1% MVP (Multi-12 pediatrics<sup>®</sup>, Sandoz, Boucherville, Qc, Canada) + 1.5% (v,v) lipids (Intralipid<sup>®</sup>, Fresenius Kabi, Toronto, ON, Canada). After 3 hours incubation at room temperature under 66 foot-candles fluorescent light exposure, peroxide concentrations were measured.

#### **Experiment 2:** To test the effect of HM vs. artificial milk on the prevention of the induction of oxidative stress by infused peroxides.

Three-day-old male Hartley guinea pigs (Charles River, St-Constant, QC, Canada) (body weight = 104±1 g, n = 26) received intravenous solutions (described below in the *Intravenous protocol*) via a catheter secured in their right jugular vein (21). Infusions of 200 to 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> daily in this animal model induces hepatic lipid peroxidation as indicated by increased F<sub>2α</sub>-isoprostane levels (21). This amount of infused peroxides was comparable to the ~ 400 µM peroxides (1) measured in TPN as previously reported (4) and measured in the present study, of which 80% are H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4). At the infusion rate of 240 ml/kg/d, the animals received 40 to 120 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/kg/d (21). In the present study (Figure 1), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was administered in this range.

*Intravenous protocol:*

- i) During the first 18 hours following catheter placement, animals received intravenous solutions containing: 1U/ml heparin + 0.45% (w/v) NaCl + 8.7% (w/v) dextrose ± 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (infusion rate = 240 ml/kg/d). Thus, animals on  $\text{H}_2\text{O}_2$  received 120  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ /kg/d.
- ii) From day 2 to 4, during the day (6:00 a.m. to 6:00 p.m.), animals received intravenous solutions containing: 1U/ml heparin + 0.9% NaCl ± 755  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (infusion rate = 150 ml/kg/d). Animals on  $\text{H}_2\text{O}_2$  received 113  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ /kg/d and were fed regular chow, HM or AM (see below).
- iii) From day 2 to 4, during the night (6:00 p.m. to 6:00 a.m.), animals received intravenous solutions containing: 1U/ml heparin + 0.45% NaCl + 5% dextrose ± 755  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (infusion rate = 150 ml/kg/d). Animals on  $\text{H}_2\text{O}_2$  received 113  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ /kg/d.

*Experimental groups:*

- 1) Group C (control): From day 2 to 4, animals were fed regular guinea pig chow (2041-Teklad Global High Fiber Guinea Pig Diet, Harlan-Canada, Montreal, Qc, Canada) and had free access to chow and water. Their intravenous solution was devoid of added  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- 2) Group C +  $\text{H}_2\text{O}_2$ : Animals were fed the same diet as the group C except that the intravenous solutions contained  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- 3) Group HM (provided from pooled human donors was lyophilized by JKF): From day 2 to 4, every two hours (five times a day), the mouth of the animal was filled with 1.5 ml

of reconstituted milk (20 g in 100 ml water). Animals had free access to water. Their intravenous solution was devoid of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

- 4) Group HM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Animals were treated as the HM group, except that their intravenous solution contained H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- 5) Group AM (prepared from Carnation Good Start, Nestle Canada): From day 2 to 4, every two hours (five times a day), the mouth of the animal was filled with 1.5 ml of AM (20 g in 100 ml water). Animals had free access to water. Their intravenous solution was devoid of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- 6) Group AM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Animals were treated as the AM group, except that their intravenous solutions contained H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Experiment 3:** To analyze the in vivo effect of TPN enriched with HM-derived specific peptides.

Three-day-old guinea pig pups (body weight 99±2 g, n = 17) were infused with TPN solutions as previously described (21) for 4 days *via* a catheter secured in their right jugular vein. TPN was administered in a binary mode, with lipid emulsion (1.5%) separated from other components (1% MVP + 2.2% amino acid + 8.7% dextrose ± 1 mM peptides (a concentration close to those of other amino acids in TPN)). TPN solutions were infused without light protection. The effects of peptides were compared in three groups of animals:

- 1) TPN: Animals receiving TPN without addition of peptide.
- 2) TPN+A: Animals receiving TPN containing 1 mM peptide-A (YGYTGA).
- 3) TPN+B: Animals receiving TPN containing 1 mM peptide-B (ISELGW).

Daily-prepared TPN solutions were infused continuously at a rate of 220 ml/kg/d (animals receiving 4.8 g/kg/d of amino acids and 3.2 g/kg/d of lipids).

For both *in vivo* protocols, after four days of treatments, the liver was collected, rinsed in 0.9% NaCl, rapidly minced and aliquoted; one aliquot was immediately treated for glutathione determination and the others stored at -80°C.

Guinea pigs were housed in an animal facility on a 12 hr light/dark cycle at constant temperature. The study was approved by the Institutional Review Board for the care and handling of animals (CHU Sainte-Justine), in accordance with guidelines of the Canadian Council of Animal Care.

### ***Methods***

Glutathione: Reduced (GSH) and disulfide form (GSSG) of glutathione were determined as previously described (1) by using capillary electrophoresis P/ACE MDQ system (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada). The redox potential was calculated using the Nernst equation (25°C, pH 7.0) (22).

F<sub>2α</sub>-isoprostanes: They were measured (21) using a commercial enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA).

Peroxide concentrations: were determined in TPN solutions by using the Ferrous-oxidation xylenol orange assay as previously described (23), using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. for the standard curve.

GS-HNE: Hepatic levels of glutathionyl 1,4-dihydroxynonenal (GS-HNE) were measured by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry using Eclipse Plus C18 column coupled with an Agilent 1100 single quadrupole (Agilent, Montreal, QC,

Canada). The approach used (24) is based on a differentiation of the aldehyde from the alcohol by reduction with 1 M NaB<sup>2</sup>H<sub>4</sub> (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA), generating stable [<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]DHN. Briefly, liver sample homogenized in buffer (HEPES 39 mM, EDTA 0.4 mM, butylated hydroxytoluene 0.9 mM, pH 7.4) was treated with NaB<sup>2</sup>H<sub>4</sub> and spiked with internal standard GS-[<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]DHN, made from [9, 9, 9-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]trans-4-hydroxy-2-nonenal (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI), before proteins precipitated by 5-sulfosalicylic acid. GS-[<sup>2</sup>H]DHN and internal standard GS-[<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]DHN were directly detected in the supernatant at *m/z*=467 and 470 respectively. Operating parameters were a cone voltage of 60V, source block temperature of 350°C, nitrogen nebulizer gas flow at 12 l/min and acquisition time between 8 and 18 min.

TNF $\alpha$  and IL-1 mRNA levels: Total RNA was isolated from 100mg of liver after homogenization in 1 ml of Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) + 200  $\mu$ l of chloroform and centrifuged at 31,200xg for 15 min at 4°C. The RNA from supernatant was precipitated in 500  $\mu$ l isopropanol for 10 min. After 10 min centrifugation at 31,200xg at 4°C, the pellet was washed in 500  $\mu$ l ethanol 70% and centrifuged at 31,200xg for 5 min at 4°C. The dried pellet (37°C, 1hr) was solubilized in RNase free water. RNA concentration was determined by the ratio of absorbance read at 260/280 nm. One hundred ng were reverse-transcribed by using Quantitect Reverse transcription Kit (Qiagen, Montréal, Qc Canada). Levels of mRNA were quantified by real-time PCR using SYBR green I labeling method. Sequences of primer sets are shown in **table 1**. The amplification protocol was: denaturation at 95°C for 5 min followed by 40 cycles of “95°C/10s, 64°C/30s”. mRNA levels of target genes are reported as  $\Delta$ CT values (cycle number at which PCR target plots

cross threshold, normalized to the expression levels of 18S rRNA), and converted to relative expression  $2^{-\Delta\Delta CT}$  where  $\Delta CT$  values of target genes are normalized to a control value, as described by Livak (25).

### ***Statistical analyses***

Data, expressed as mean  $\pm$  SEM, were compared by ANOVA after verification of the homoscedasticity by Bartlett's Chi-squared test. All comparisons were orthogonal and are described in the figures. In the first protocol (**Figure 2A**), the impact on redox potential of HM was compared to animals receiving AM. The effects of milk used as food were compared to a control group fed with regular guinea pig chow. For  $F_{2\alpha}$ -isoprostane determinations (Figure 2B), the comparisons were (C vs. HM) vs. AM. The impacts of infusion of  $H_2O_2$  at similar levels to those measured in TPN, according to the enteral food were compared in a factorial ANOVA. In the second protocol (**Figure 3**), the following comparisons have been made: [(40 mM vs. 20 mM) vs. 10 mM] vs. 0 mM. In the third protocol (**Figures 3 & 4**), TPN containing peptide-A has been compared to TPN + peptide-B, and both have been compared to TPN without peptide addition. Statistical analysis of  $TNF\alpha$  and IL-1 mRNA levels were achieved with  $\Delta CT$  values, and graphically represented as relative expression  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . The threshold of significance was assigned to  $p < 0.05$ .

## RESULTS

The levels of peroxides generated in TPN solutions (Figure 3) were lower ( $F_{(1,12)}=10.2$ ;  $p<0.01$ ) in presence of peptide-A without any difference ( $F_{(1,12)}=0.5$ ) according to concentration (10 to 40 mM). Peptide-B was without effect ( $F_{(1,12)}<1.4$ ).

An interaction ( $F_{(1,24)}>8.9$ ;  $p<0.01$ ) between parameters influencing the hepatic redox potential of glutathione (Figure 2A) allowed us to reanalyze data in the presence or absence of intravenous  $H_2O_2$ . In the absence of peroxide, it was less oxidized ( $F_{(1,24)}=18.5$ ;  $p<0.01$ ) in the HM than the AM group, but no difference was observed ( $F_{(1,24)}=0.01$ ) between HM and the control group. In animals infused with  $H_2O_2$ , there was no difference between the HM and AM groups ( $F_{(1,24)}=1.1$ ). However, it was more oxidized compared to the control group ( $F_{(1,24)}=16.9$ ;  $p<0.01$ ).

The diet effect on the redox potential seems to be linked to changes in the GSH levels (**Table 2**), since the results of statistical analyses were similar: 1) interaction between parameters ( $F_{(1,24)}>9.1$ ;  $p<0.01$ ); 2) in the absence of  $H_2O_2$ , GSH levels were higher in the HM group than they were in the AM group ( $F_{(1,24)}=19.0$ ;  $p<0.01$ ), without difference ( $F_{(1,24)}=0.04$ ) with the control group; 3) in the presence of  $H_2O_2$ , GSH levels did not differ between the HM and AM groups ( $F_{(1,24)}=0.2$ ), but were lower than those of the control group ( $F_{(1,24)}=16.7$ ;  $p<0.01$ ). Conversely, there was no interaction ( $F_{(1,24)}<2.6$ ) between parameters for GSSG. Its level, similar between the HM and AM groups ( $F_{(1,24)}=0.1$ ), was lower in the control group ( $F_{(1,24)}=5.0$ ;  $p<0.05$ ). There was no effect of infused peroxide ( $F_{(1,24)}=2.4$ ).

The interaction ( $F_{(1,24)}=6.2$ ;  $p<0.05$ ) between parameters influencing  $F_{2\alpha}$ -isoprostane levels (Figure 2B), suggests that the impact of diet was dependent on the presence of  $H_2O_2$ . In the absence of  $H_2O_2$ , there was no difference between HM, AM, and C groups ( $F_{(1,24)}<0.2$ ). In contrast, in the presence of infused  $H_2O_2$ ,  $F_{2\alpha}$ -isoprostane level was higher ( $F_{(1,24)}=15.7$ ;  $p<0.01$ ) in the AM group than in the HM and C groups. There was no difference between HM+  $H_2O_2$  and C+  $H_2O_2$  groups ( $F_{(1,24)}=0.2$ ). The hepatic levels of GS-HNE were similar ( $F_{(1,22)} < 3.3$ ) between these six groups (Figure 2) with a mean value of  $2.4\pm 0.2$  pmol/mg protein ( $n=28$ ).

Compared to the control TPN (without light protection), peptide supplementations reduced ( $F_{(1,14)}=12.2$ ;  $p<0.01$ ) the hepatic redox potential (Figure 4A). There was no difference between peptides ( $F_{(1,14)}=0.2$ ). The difference in redox potential is linked with a higher level ( $F_{(1,14)}=7.6$ ;  $p<0.05$ ) of GSH (**Table 3**) in animal infused with TPN enriched with peptides. GSSG levels were not influenced by the presence of peptides ( $F_{(1,14)}<1.1$ ).

Levels of  $F_{2a}$ -isoprostane (Figure 4B) did not vary between groups ( $F_{(1,14)}<2.0$ ) whereas GS-HNE levels (Figure 4C) were lower ( $F_{(1,14)}=9.2$ ;  $p<0.01$ ) in liver from animals infused with TPN enriched with peptide-A or -B compared to liver from animals receiving TPN without peptide. There was no difference in GS-HNE between animals infused with peptide-A or -B ( $F_{(1,14)}=0.2$ ).

Hepatic mRNA of  $TNF\alpha$  and of IL-1 (Figure 5) were lower ( $F_{(1,14)} > 4.9$ ;  $p<0.05$ ) when TPN was supplemented with peptides. The effect of peptide-A was similar to that of peptide -B on both cytokines ( $F_{(1,14)} < 1.4$ ).



## DISCUSSION

The main finding of the study is that a nutritional alternative for the prevention of oxidative stress caused by peroxide from TPN in premature newborns is possible. Our results demonstrate that peptides from human milk have properties that may be useful for this population.

The present study also provides evidence that enteral HM is better than AM in counteracting free radical injuries (lower  $F_{2\alpha}$ -isoprostane levels) induced by infusion of peroxides at concentrations measured in TPN solutions. In fact, AM was low in antioxidant capacity whereas HM had a similar effect to that of regular chow. Compared to a previous report with the same animal model infused with  $H_2O_2$  (21), measured hepatic levels of  $F_{2\alpha}$ -isoprostane suggest that AM is without antioxidant effect. Our results are in agreement with the observation that urinary levels of  $F_{2\alpha}$ -isoprostanes are lower in newborn infants fed HM compared to those nourished with formula (18). However, compared to regular chow, there was no advantage of HM as suggested by the absence of a beneficial effect on hepatic redox potential in animals infused with peroxides. Further comparisons of chemical compounds between chow and milks used here could provide new information to improve the antioxidant properties of HM or AM.

If the neonates cannot be orally fed they require TPN. Added into TPN, the peptide-A reduced by half the generation of peroxides in TPN, similarly to the results obtained with full light protection (2). This finding was not reproduced with the peptide-B, suggesting that free radical scavenging properties are peptide specific. Peptide-A (YGYTGA) contains two phenolic groups from tyrosyl residues (Y) that can serve as radical scavengers (26)

whereas the free radical scavenging property of the peptide- B (ISELGW) was reported to be linked with the tryptophan residue (W) (27). Since the generation of  $H_2O_2$  in TPN is secondary to the reduction of superoxide anion (2), a further study would challenge the superoxide anion scavenging capacity of these peptides.

The *in vivo* part of the present study demonstrates that the peptides-A and -B have significant effects on markers of oxidative stress and on mRNA of pro-inflammatory cytokines. Furthermore, these effects are different than those observed in animals fed human milk. The route of administration (parenteral vs. enteral), the dose or intestinal absorption can explain the difference. For instance, the hepatic redox potentials calculated in animals infused with  $H_2O_2$  fed with AM (Figure 2A), or with TPN without light protection and additional peptides (Figure 4A) were similarly oxidized. Supplementation of TPN with peptides protected this redox shift through an oxidized status whereas HM was without effect. The high GSH level in liver from the TPN + peptides groups, explaining their more reduced redox potential, suggests that peptides could favor glutathione synthesis. This provides a basis for future studies that will be important for the premature newborn population in whom the level of glutathione is low (7, 8) although they have a normal capacity of synthesis (28, 29). The fact that an early administration of amino acids in premature infants favored the glutathione synthesis (28), supports the notion that amino acids availability may be a limiting step for this synthesis. Since both peptides contains glycine, one of the glutathione constituents, the impact of peptides on GSH levels may derive from the hydrolysis of their amino acids. Because the maximum release of glycine from peptide is 1mM compared to the 3 mM from TPN, and that glycine is not known to be the limiting step for GSH synthesis, the probability of a greater amino acid availability

explaining the higher GSH levels is not very probable. However, the hydrolysis hypothesis is nevertheless interesting. As mentioned above, the free radical scavenging abilities of peptides may be related to their tyrosine or tryptophan content. The complete hydrolysis of peptides could provide 2 mM tyrosine and 1 mM tryptophan, which are considerably higher than the amount usually present in TPN solution that are about 0.04 mM for tyrosine and 0.2 mM for tryptophan.

On the other hand, the *in vivo* free radical scavenging property of HM has been reproduced with peptides. Even if F<sub>2α</sub>-isoprostane levels did not reach statistically significant difference between groups, the hepatic levels of GS-HNE were lower in animals infused with TPN containing peptides when compared to those animals receiving only TPN. Both, F<sub>2α</sub>-isoprostanes and HNE derive from lipid peroxidation a free radical attack. In liver, HNE is detoxified during a *glutathionylation*, in which the product, GS-HNE, is actively exported in bile (30). The fact that GS-HNE was very low ( $2.4 \pm 0.2$  pmol/mg protein) in liver from animals enterally nourished suggests that GS-HNE measured in animals on TPN ( $58.0 \pm 9.9$  pmol/mg protein) could be associated with a lower bile flow, a well-known complication of TPN administration such as cholestasis. Thus, by their antioxidant properties, the tested peptides could contribute to the reduction of the incidence of cholestasis in newborns on TPN. The observation of lower mRNA levels of pro-inflammatory cytokines TNF $\alpha$  and IL-1 supports the notion that these peptides exert an *in vivo* antioxidant property. Since the presence of these pro-inflammatory cytokines is cited as part of hepatic TPN-related liver diseases such as cholestasis (31), the relation between HNE and bile flow is reinforced. However, since amino acids have a main impact on

reduction of bile flow (32), HNE might have only a partial impact on cholestasis, which may be related to its inflammatory properties. Indeed, cholestasis has been shown to be associated with bacterial infection (33), a condition associated with oxidative stress (34) and generation of lipid aldehydes such as HNE (35, 36).

The aim was to test the capacity of new hexapeptides to reduce oxidative stress associated with TPN. Our results show that hexapeptides exert in liver antioxidant actions that are accompanied by lower levels of tow cytokine expressions. Although the beneficial effect of these peptides on hepatic cholestasis is not yet proved, this study brings hope to neonatal units where the incidence of several complications of prematurity associated with oxidative stress is high. Results demonstrate also that the enrichment of TPN solutions with these isolated peptides from HM seems more prone to improve the antioxidant defenses of the neonates than the whole HM. However, before the extrapolation of these data to the clinic, further studies should delineate the optimal peptide concentrations as well as the mechanisms involved.

**REFERENCES**

1. Chessex P, Watson C, Kaczala GW, Rouleau T, Lavoie ME, Friel J, et al. Determinants of oxidant stress in extremely low birth weight premature infants. *Free Radic Biol Med* 2010;49:1380-6.
2. Laborie S, Lavoie JC, Chessex P. Paradoxical role of ascorbic acid and riboflavin in solutions of total parenteral nutrition: implication in photoinduced peroxide generation. *Pediatr Res* 1998;43:601-6.
3. Lavoie JC, Belanger S, Spalinger M, Chessex P. Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition: the major contributor to in vitro generation of peroxides. *Pediatrics* 1997; 99:E6.
4. Pitkanen OM. Peroxidation of lipid emulsions: a hazard for the premature infant receiving parenteral nutrition? *Free Radic Biol Med* 1992;13:239-45.
5. Pitkanen O, Hallman M, Andersson S. Generation of free radicals in lipid emulsion used in parenteral nutrition. *Pediatr Res* 1991;29:56-59.
6. Srivastava SK, Singhal SS, Awasthi S, Pikula S, Ansari NH, Awasthi YC. A glutathione S-transferases isozyme (bGST 5.8) involved in the metabolism of 4-hydroxy-2-trans-nonenal is localized in bovine lens epithelium. *Exp Eye Res* 1996;63:329-37.
7. Thibeault DW. The precarious antioxidant defenses of the preterm infant. *Am J Perinatol* 2000;17:167-81.
8. Lavoie JC, Chessex P. Gender and maturation affect glutathione status in human neonatal tissues. *Free Radic Biol Med* 1997;23:648-57.
9. Lee JW, Davis JM. Future applications of antioxidants in premature infants. *Curr Opin*

- Pediatr 2011;23:161-6.
- 10 Saugstad OD. Oxygen and oxidative stress in bronchopulmonary dysplasia. *J Perinat Med* 2010;38:571-7.
  - 11 Weinberger B, Watorek K, Strauss R, Witz G, Hiatt M, Hegyi T. Association of lipid peroxidation with hepatocellular injury in preterm infants. *Crit Care* 2002;6:521-5.
  - 12 Uchida K, Szweda LI, Chae HZ, Stadtman ER. Immunochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in oxidized hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8742-6.
  - 13 Guichardant M, Taibi-Tronche P, Fay LB, Lagarde M. Covalent modifications of aminophospholipids by 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* 1998;25:1049-56.
  - 14 Kowalczyk P, Ciesla JM, Komisarowski M, Kusmierk JT, Tudek B. 2004 Long-chain adducts of trans-4-hydroxy-2-nonenal to DNA bases cause recombination, base substitutions and frameshift mutations in M13 phage. *Mutat Res* 2004;550:33-48.
  - 15 Liu W, Kato M, Akhand AA, Hayakawa A, Suzuki H, Miyata T, et al. 4-hydroxynonenal induces a cellular redox status-related activation of the caspase cascade for apoptotic cell death. *J Cell Sci* 2000;113:635-41.
  - 16 Ruef J, Moser M, Bode C, Kübler W, Runge MS. 4-hydroxynonenal induces apoptosis, NF-kappaB-activation and formation of 8-isoprostane in vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol* 2001;96:143-50.
  - 17 Ledo A, Arduini A, Asensi MA, Sastre J, Escrig R, Brugada M, et al. Human milk enhances antioxidant defenses against hydroxyl radical aggression in preterm infants. *Am J Clin Nutr* 2009;89:210-5.

- 18 Friel JK, Martin SM, Langdon M, Herzberg GR, Buettner GR. Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infant formula. *Pediatr Res* 2002;51:612-8.
- 19 Shoji H, Oguchi S, Shimizu T, Yamashiro Y. Effect of human breast milk on urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion in infants. *Pediatr Res* 2003;53:850-2.
- 20 Tsopmo A, Romanowski A, Banda L, Lavoie J, Jenssen H, Friel J. Novel anti-oxidative peptides from enzymatic digestion of human milk. *Food Chem* 2011;126:1138-43.
- 21 Chessex P, Lavoie JC, Rouleau T, Brochu P, St-Louis P, Levy E, et al. Photooxidation of parenteral multivitamins induces hepatic steatosis in a neonatal guinea pig model of intravenous nutrition. *Pediatr Res* 2002;52:958-63.
- 22 Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1191-212.
- 23 Lavoie JC, Laborie S, Rouleau T, Spalinger M, Chessex P. Peroxide-like oxidant response in lungs of newborn guinea pigs following the parenteral infusion of a multivitamin preparation. *Biochem Pharmacol* 2000;60:1297-303.
- 24 Veronneau M, Comte B, Des Rosiers C. Quantitative gas chromatographic-mass spectrometric assay of 4-hydroxynonenal bound to thiol proteins in ischemic/reperfused rat hearts. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1380-8.
- 25 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.

- 26 Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med* 1999;27:1151-63.
- 27 Tsopmo A, Diehl-Jones BW, Aluko RE, Kitts DD, Elisia I, Friel JK. Tryptophan released from mother's milk has antioxidant properties. *Pediatr Res* 2009;66:614-8.
- 28 te Braake FWJ, Schierbeek H, de Groof K, Vermes A, Longini M, Buonocore G, van Goudoever JB. Glutathione synthesis rates after amino acid administration directly after birth in preterm infants. *Am J Clin Nutr* 2008;88:333-9.
- 29 Lavoie JC, Chessex P. Development of glutathione synthesis and  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase activities in tissues from newborn infants. *Free Rad Biol Med* 1998;24:994-1001.
- 30 Pedersen WA, Cashman NR, Mattson MP. The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal impairs glutamate and glucose transport and choline acetyltransferase activity in NSC-19 motor neuron cells. *Exp Neurol* 1999;155:1-10.
- 31 Donner MG, Schumacher S, Warskulat U, Heinemann J, Haussinger D. Obstructive cholestasis induces TNF-alpha- and IL-1 -mediated periportal downregulation of Bsep and zonal regulation of Ntcp, Oatp1a4, and Oatp1b2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G1134-46.
- 32 Lavoie JC, Chessex P, Gauthier C, Levy E, Alvarez F, Rouleau T. The TPN-related reduction in bile flow is independent of oxidant load and antioxidant vitamins. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;41:108-14.
- 33 Wolf A, Pohlandt F. Bacterial infection: the main cause of acute cholestasis in newborn infants receiving short-term parenteral nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*



- J Pediatr Gastroenterol Nutr J 1989;8:297-303.
- 34 Sebai H, Sani M, Yacoubi MT, Aouani E, Ghanem-Boughanmi N, Ben-Attira M. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat liver. *Ecotoxicol Environ Saf* 2010;73:1078-83.
- 35 Sebai H, Sani M, Aouani, E, Ghanem-Boughanmi N. Cardioprotective effect of resveratrol on lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat. *Drug and Chemical Toxicology* 2011;34:146-50.
- 36 Fagundes DS, Gonzalo S, Arruebo MP, Plaza MA, Murillo MD. Melatonin and Trolox ameliorate duodenal LPS-induced disturbances and oxidative stress. *Dig Liver Dis* 2010;42:40-4.

**FIGURE LEGENDS:**

**Figure 1: Experimental design for the first *in vivo* protocol generating data for figure 2.**

**Figure 2: Redox potential of glutathione and levels of  $F_{2\alpha}$ -isoprostanes in liver of animals infused with  $\pm H_2O_2$  and fed regular chow, human milk or formula.**

C: animals fed regular chow; HM: animals fed human milk; AM: animals fed artificial milk;  $\pm H_2O_2$ : animals infused (open bars) or not (dark bars) with solution containing  $H_2O_2$  at similar concentration as measured in TPN solutions. Panel A: In absence of peroxide, redox potential was more reduced in HM than in AM group. In animals infused with peroxides, there was no difference in redox potential between HM and AM groups, both were more oxidized than control group. Panel B: In absence of peroxide, there was no difference between groups. In animals infused with peroxides,  $F_{2\alpha}$ -isoprostane level was higher in the AM group than in HM and C groups. Mean  $\pm$  SEM, n= 4-6; \*\*: p<0.01.

**Figure 3: Concentration of peroxides in TPN solutions in the presence of the peptides-A and -B.**

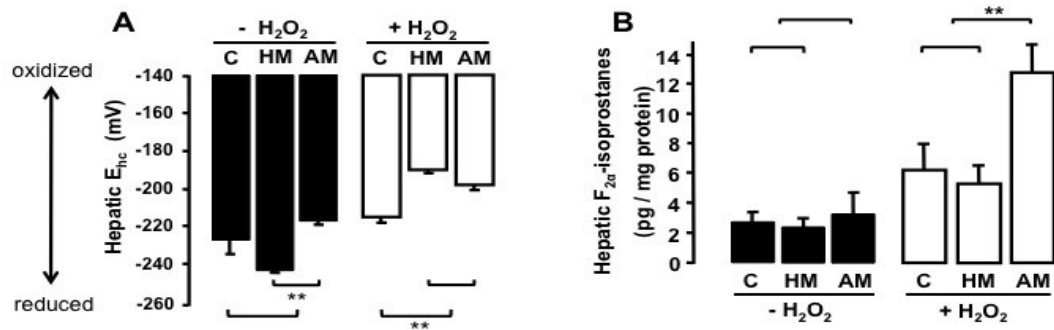
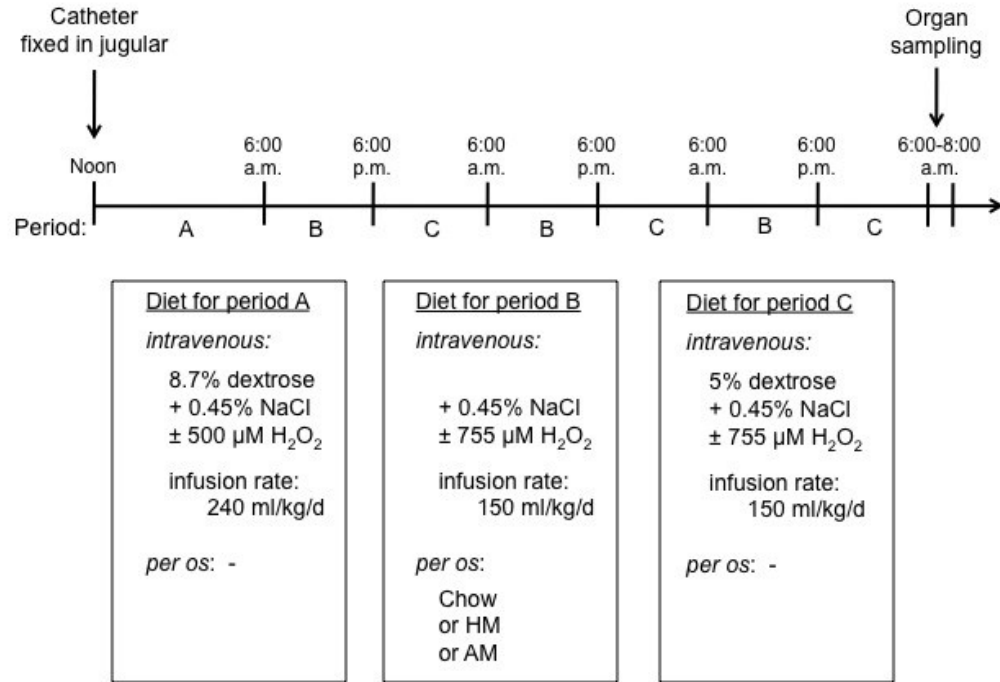
TPN: Total parenteral nutrition. Panel A: The concentration of peroxides was lower in TPN solution in presence of the peptide-A (YGYTGA) independently of the concentration of the peptide. Panel B: Peptide-B (ISELGW) was without effect on the generation of peroxides in TPN solution. Mean  $\pm$  SEM, n= 4; \*\*: p<0.01.

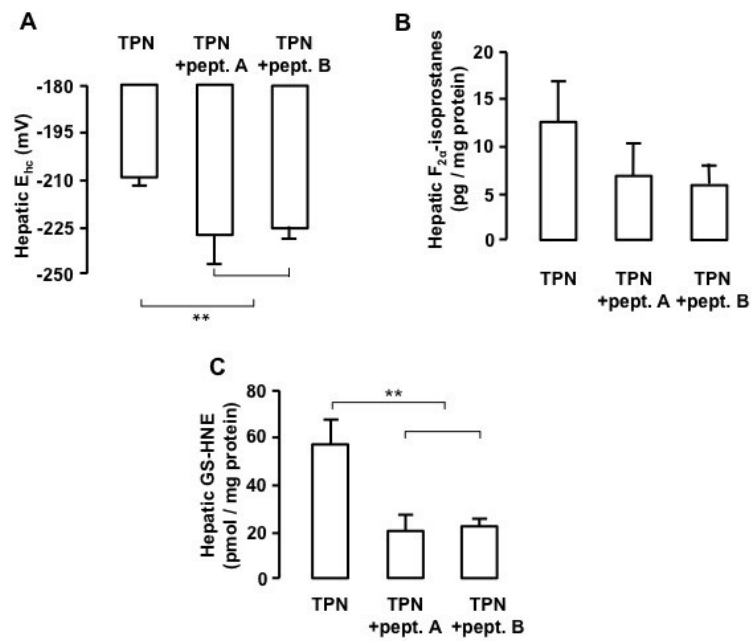
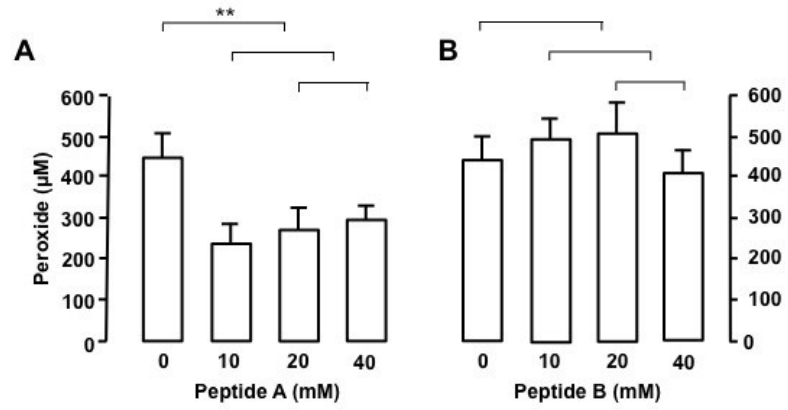
**Figure 4: Oxidative stress markers in liver from animals infused with TPN containing or not the peptide-A or -B.**

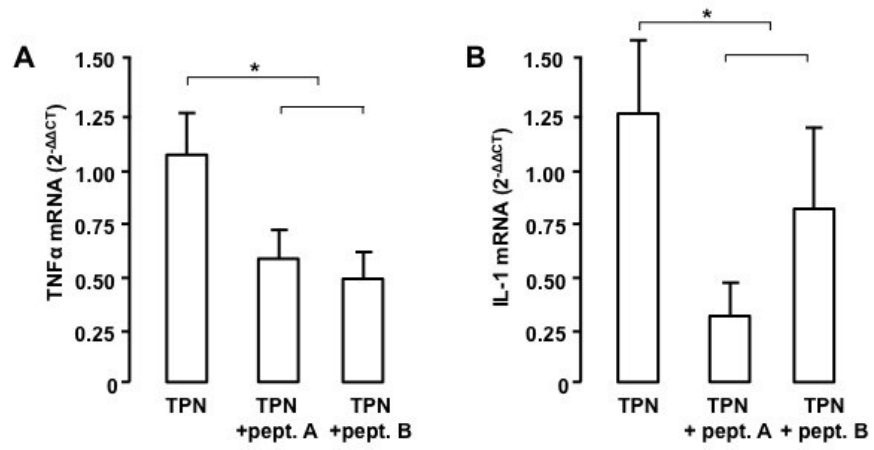
TPN: Total parenteral nutrition; pept.: peptide; pept.-A: YGYTGA; pept.-B: ISELGW. Panel A: Hepatic redox potential was more reduced if animals were infused with TPN containing peptide A or B than in animals on TPN without peptide. Both peptides had similar effect. Panel B: There was no statistically significant effect of peptides on the hepatic levels of isoprostane F<sub>2a</sub>. Panel C: Hepatic GS-HNE (glutathione-4-hydroxynonenal adducts) was lower in animals infused with TPN containing peptide-A or -B than in animals receiving TPN without peptides. Both peptides had similar effects. Mean  $\pm$  SEM, n= 5-6; \*\*: p<0.01.

**Figure 5: mRNA levels of TNF $\alpha$  and IL-1 in liver from animals infused with TPN containing or not the peptide-A or -B.**

TPN: Total parenteral nutrition; pept.: peptide; pept.-A: YGYTGA; pept.-B: ISELGW. The mRNA levels of TNF $\alpha$  (panel A) and IL-1 (panel B) were lower in liver from animals infused with TPN containing the peptide-A or -B than in animals on TPN without peptides. Both peptides exerted similar effect. Mean  $\pm$  SEM, n= 5-6; \*: p<0.05.







## **DISCUSSION GÉNÉRALE**

La compréhension des mécanismes conduisant à la genèse des pathologies hépatiques induites par la TPN n'est pas encore claire. La physiopathologie associée à la nutrition parentérale se caractérise par une composante inflammatoire contribuant à la progression des affections allant jusqu'à la destruction du tissu.

La connaissance des événements d'oxydation comprend une séquence post-inflammatoire, dans laquelle le stress oxydant est une conséquence de l'activation de cellules immunitaires. Du fait de l'association entre métabolites d'oxydation et processus d'induction de l'inflammation, nous avons considéré la possibilité que les molécules oxydantes de la TPN puissent jouer un rôle d'inducteur du développement des maladies hépatiques induites par l'utilisation de TPN.

Afin de mettre en évidence la relation existante entre oxydation des composés nutritifs et développement de l'inflammation hépatique, il a fallu choisir le modèle animal adéquat. La validité de ce dernier en ce qui concerne l'extrapolation possible des résultats à l'Homme dépend d'un choix raisonné. Il se doit de décrire un phénomène biologique qu'il possède en commun avec l'espèce ciblée, d'où l'orientation vers un modèle de vertébrés supérieurs.

Le chat a été exclu de par sa propension à développer des complications métaboliques telles que la thrombocytopénie [317] et l'anémie [318]. Le chien quant à lui présente l'inconvénient de voir son anabolisme accru sous TPN, ce qui est l'inverse de ce qui est observé chez l'Homme [319]. Le mini-porc aurait pu être utilisé pour nos travaux, mais pour des raisons de faisabilité et de coûts, nous avons opté pour le cochon d'Inde, bien établi dans l'étude de la nutrition parentérale. Il présente un système antioxydant pouvant être déplété, ce qui confère un grand avantage dans l'étude du stress oxydant en comparaison avec le rat par exemple, qui biosynthétise l'acide ascorbique. Il fonctionne d'ailleurs en routine depuis plusieurs années au sein du laboratoire, ce qui présente le grand avantage de connaître et de pouvoir se référer i) aux valeurs témoins des métabolites déjà mesurés dans le passé, ii) de connaître le nombre d'animaux nécessaire à l'obtention d'une différence significative dans nos mesures (n autour de 6).

Ce modèle se heurte toutefois à certaines limites, qui rendent difficile sa transposition parfaite à l'étude de la NP sur des enfants prématurés. Nous avons choisi de



travailler sur un animal de 3 jours de vie, donc mûre. Certains développements de notre projet, comme l'administration de lait ou de nourriture solide *per os*, nous ont obligé à utiliser un animal mûre pouvant s'alimenter seul et possédant un système gastro-intestinal fonctionnel. Utiliser un animal mûre constitue donc une première limite dans le cadre de l'extrapolation des données dans le cadre de la situation d'un enfant prématuré.

L'utilisation du cochon d'Inde dans l'étude des conséquences de l'utilisation de la nutrition parentérale pose un autre problème de taille : son incapacité à évoluer vers une cholestase associée à la NP. Plusieurs travaux [320] ont en effet mis en évidence la résistance de cet animal à développer cette pathologie. Ceci implique une difficulté à observer des lésions hépatiques. L'absence d'atteintes histologiques constitue donc une limite dans le modèle du cochon d'Inde. Prolonger la durée de la NP devient de ce fait inutile; c'est l'une des raisons pour lesquelles nous utilisons notre modèle sur 4 jours de vie, en plus du problème de maintien de la fonctionnalité des cathéters au bout de plusieurs jours. Cependant il est important de nuancer cet aspect par le fait que nos travaux n'avaient pas pour but l'étude d'une cholestase mais des conséquences oxydatives de la NP sur le développement d'un processus pro-inflammatoire transposable chez les enfants prématurés.

## **1. STRESS OXYDANT SOUS NUTRITION PARENTÉRALE**

La génération de molécules à potentiel toxique est étudiée dans les différents compartiments de la NP depuis plus de 30 ans. Des recherches portant sur l'oxydation des acides aminés ont notamment mis en évidence le rôle du tryptophane oxydé dans la pathogenèse de dysfonctions hépatiques chez la gerboise [321]. D'autres travaux se sont focalisés sur les produits de la peroxydation lipidique, notamment la production d'hydroperoxydes [90, 91, 322, 323] ou encore les concentrations augmentées de MDA après auto-oxydation de la NP [324]. Ces données s'accordent sur la sensibilité à l'oxydation de la NP en fonction de la température, l'oxygène, le pH et l'exposition à la lumière. Ce dernier paramètre a été particulièrement mis en évidence lors d'études démontrant notamment que la photoprotection des solutions permettait de réduire de moitié

la génération de peroxydes [325]. Le problème réside dans la mise en place pratique de cette mesure dans les unités de néonatalogie. D'autres alternatives davantage axées sur la formulation des solutions ont été mises en place dans le but de réduire la production d'espèces oxydantes.

L'initiation des réactions conduisant à l'oxydation des solutions est essentiellement tributaire de la réaction décrite par Cardoso *et al* [85] entre l'oxygène singulet dissout et le radical ascorbate. Il a été ainsi montré que les espèces radicalaires produites initient un processus d'oxydation susceptible de s'attaquer à l'émulsion lipidique et générer plusieurs sous-produits dont les hydroxy-alkénals font partie.

La première partie de nos travaux (article 1) a consisté à montrer qu'une partie des hydroperoxydes formés sous exposition lumineuse aboutissent à la libération de 4-HNE dans la solution de NP.

### ***Les hydroxy-alkénals générés par la nutrition parentérale***

Nos résultats ont permis de démontrer la génération de 4-HNE dans 2 formulations différentes de NP visant à moduler les niveaux d'hydroxy-alkénals. De par son effet modulateur des voies de transduction du signal et de régulation des facteurs de transcription [89, 326], le 4-HNE pourrait être impliqué dans le déclenchement des processus inflammatoires.

Si nos données corroborent l'action pro-oxydante de la lumière sur la NP, elles ne confirment cependant pas l'effet antioxydant des multivitamines ajoutées à l'émulsion lipidique. Ceci avaient été démontré par Silvers *et al*, mettant en avant la diminution des niveaux d'hydroperoxydes lorsque les multivitamines étaient mélangées aux lipides [90, 91]. Nos résultats démontrent au contraire que cette configuration est pro-oxydante. Cette différence peut être imputable aux conditions d'expériences, puisque nos résultats ont été obtenus à partir d'une TPN complète, contrairement à ceux de Silvers *et al* [90, 91] qui se sont basés uniquement sur l'émulsion lipidique. D'autre part, une diminution des niveaux d'hydroperoxydes peut également être expliquée par leur fragmentation en autres espèces

chimiques. Il devient alors plus pertinent de penser que la quantification d'un métabolite final tel que le 4-HNE nous donne une évaluation plus juste de la peroxydation des solutions lipidiques.

### ***Infusion de 4-HNE et stress oxydant***

Un stress oxydant inhérent à l'oxydation des composés nutritifs a été précédemment évoqué. Nous avons donc cherché à examiner l'état redox hépatique et les niveaux de marqueurs de stress oxydant après 4 jours de nutrition parentérale dans des conditions générant du 4-HNE.

Pour cela, nous avons choisi dans un premier temps la mesure des concentrations de glutathion (oxydé et réduit) hépatique dont le changement en termes d'équilibre redox peut directement induire des dommages cellulaires et un processus apoptotique [121, 196]. De plus, c'est un marqueur cliniquement intéressant puisque l'association entre le redox du glutathion plus oxydé et la sévérité de la dysplasie broncho pulmonaire, une autre complication importante de la grande prématurité, a été démontrée [327]. Nous avons dans un second temps choisi d'évaluer le stress oxydant hépatique par la quantification d'adduits GS-HNE. De par sa vitesse de métabolisation, le 4-HNE ne s'accumule pas ou peu dans les cellules. La part de conversion atteignant 60%, les niveaux de GS-HNE peuvent être considérés comme un reflet des niveaux de 4-HNE avant métabolisation. Il a été validé par ailleurs comme marqueur de stress oxydant dans des études mettant en évidence l'augmentation de ces adduits après exposition de foie de rat au Fe<sup>III</sup> [328]. Néanmoins, un facteur confondant réside dans le fait que le 4-HNE peut être produit dans la NP (4-HNE exogène) mais être également issu d'une peroxydation lipidique endogène (4-HNE endogène). C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de mesurer également les niveaux de F<sub>2α</sub>-isoprostanes, considéré aujourd'hui comme le marqueur le plus spécifique de la peroxydation lipidique lors d'un stress oxydant [127, 128].

Nos résultats montrent une augmentation des niveaux de GS-HNE hépatique lorsque la TPN est exposée à la lumière (article 1). Il est intéressant de constater que dans le cas des concentrations de  $F_{2\alpha}$ -isoprostanes, aucune différence significative n'est observée, suggérant ainsi fortement que la photo-exposition de la TPN n'a pas eu d'incidence sur la peroxydation lipidique endogène. Il en résulte donc que l'augmentation de 4-HNE évaluée par l'intermédiaire des concentrations d'adduits GS-HNE, est imputable à l'infusion continue de 4-HNE exogène.

En revanche, nous n'avons pas observé de modification significative du redox. Les niveaux de glutathion réduit semblent néanmoins affectés par la photo-exposition de la NP. Ce résultat peut être expliqué par la production de peroxyde d'hydrogène dans la NP, production statistiquement augmentée avec l'exposition à la lumière. Cependant, l'homéostasie cellulaire vise à protéger l'équilibre redox. Une agression oxydante peut se manifester avec une diminution des concentrations de glutathion; grâce à un mécanisme d'export du GSSG par un transport actif et à une capacité de resynthèse de GSH, le redox cellulaire tend à être maintenu. La baisse du glutathion oxydé observée dans nos résultats va dans ce sens.

### ***Activation du processus inflammatoire médié par le NFκB***

La réponse au stress oxydant et l'induction inflammatoire sont régulés dans un grand nombre de type cellulaire par le facteur de transcription nucléaire  $\kappa B$ , couramment dénommé NFκB. Au cours de ce processus, la phosphorylation du complexe cytosolique  $I\kappa B-\alpha$  par différents stimuli libère le NFκB, qui effectue alors une translocation au noyau et se fixe sur les régions promotrices de gènes pro-inflammatoires. Nous avons donc analysé l'expression protéique au niveau cytosolique et nucléaire du NFκB dans les cellules hépatiques des animaux recevant la NP photo-exposée ou -protégée. L'implication des cytokines pro-inflammatoires *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), interleukine 1 (IL-1) et interleukine 8 (IL-8) dans les phénomènes inflammatoires hépatiques ayant été largement documentée, nous avons alors choisi de mesurer le niveau de transcription de ces

molécules. Le TNF- $\alpha$  est produit au niveau du foie notamment par les cellules de Kupffer et sera responsable de l'induction des voies inflammatoires et de l'activation des processus de nécrose tissulaire [329]. L'interleukine 1, également responsable du déclenchement des processus inflammatoires hépatiques, est synthétisée par les mêmes cellules après une stimulation dépendante du TNF- $\alpha$  [330]. Enfin, l'interleukine 8 est un facteur chimio tactile synthétisé par les hépatocytes, qui participe au recrutement des cellules proinflammatoires lors des maladies hépatiques [331]. Lors des processus inflammatoires, les cellules de Kupffer libèrent le TNF- $\alpha$  qui va être capté par les récepteurs spécifiques des hépatocytes. Après internalisation dans le cytosol, le complexe agoniste-récepteur active la transcription du gène codant pour l'IL-8 [331].

Nos résultats mettent en évidence une augmentation des ARN messager des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-1 lorsque la NP est photoexposée, associée à une diminution de niveaux cytosoliques du NF $\kappa$ B et réciproquement une augmentation nucléaire. Cette élévation est également à mettre en parallèle avec les NP les plus oxydées, contenant donc plus de 4-HNE. Ces données suggèrent une activation du NF $\kappa$ B par l'aldéhyde apporté de façon exogène. Cette interprétation cadre d'ailleurs avec les résultats d'autres études montrant l'activation du NF $\kappa$ B par le 4-HNE [265, 266]. Il est intéressant de mettre en relation nos résultats avec ceux rapportant une augmentation similaire de 4-HNE lié aux protéines intracellulaires en fonction du degré d'inflammation hépatique de patients atteints de cirrhose alcoolique et de cirrhose biliaire [89, 119, 259-261].

Il faut toutefois noter ici que quelques soient les conditions, la transcription d'IL-8 ne semble pas affectée. Le délai expérimental de 4 jours pourrait potentiellement expliquer l'absence de données significatives. Cette cytokine, comme mentionné précédemment est activée après la production de TNF- $\alpha$  et l'on peut penser qu'une administration prolongée de la NP pourrait activer la transcription du gène IL-8.

### ***Les multivitamines ajoutées dans l'émulsion lipidique***

Les dosages de 4-HNE dans les solutions de NP ont montré que l'ajout des multivitamines à la solution de lipides n'empêchait pas la peroxydation et qu'en définitif, elles apparaissaient plutôt comme ayant une action pro-oxydante. Nous avons donc examiné l'impact de cette formulation (multivitamines + émulsion lipidique) dans notre modèle animal. Et les résultats obtenus sont en parfaite cohérence ; ce mélange est celui avec lequel nous observons les niveaux de GS-HNE hépatiques les plus élevés, l'activation du NFκB est la plus forte et l'expression des cytokines la plus élevée. Ces données vont à l'encontre des recommandations européennes, mais appuient les recommandations américaines. Il est donc impératif de trouver une alternative pour réduire l'oxydation de l'émulsion lipidique sous exposition lumineuse.

En conclusion, la première partie de notre travail a démontré l'activation d'un processus inflammatoire induite par un stress oxydant particulier puisqu'il s'agit de la contribution de molécules exogènes incluses dans la NP. En infusion continue, les niveaux administrés provoquent la translocation du NFκB hépatique, activant lui-même la transcription de gènes pro-inflammatoires. Il reste toutefois nécessaire de conforter ces données par de nouvelles expérimentations animales, i) par infusion directe de 4-HNE, ii) en prolongeant la durée de NP.

## **2. MODULATION DU STRESS OXYDANT PAR LES AGPI N-3**

La mise en évidence de l'importance du 4-HNE dans le processus décrit précédemment couplée à l'inefficacité des multivitamines à contrer la peroxydation lipidique nous ont conduits à envisager une approche davantage axée sur la source d'aldéhydes. Nous nous sommes alors penchés sur la nature des substrats lipidiques de la NP et sur la possibilité de changer son contenu, ou plus exactement modifier la proportion

de certains acides gras. Le 4-HNE provient en effet principalement de l'oxydation des acides arachidonique C20:4 et linoléique C18:2, tous deux faisant partie de la famille des AGPI n-6.

Les émulsions lipidiques sont constituées d'huiles de provenance variable. La solution *Intralipid20%*<sup>®</sup> contient de l'huile de soja composée de près de 51% d'acide linoléique, ce qui accroît potentiellement la possibilité de génération de 4-HNE par rapport à des solutions contenant moins de linoléate. Cette huile a fait office de référence jusqu'à ce que de nouvelles émulsions soient développées pour y associer des triglycérides à chaîne moyenne. Ils présentent l'avantage d'être plus facilement  $\beta$ -oxydés grâce à une plus grande affinité pour la lipoprotéine lipase et un passage transmembranaire mitochondrial indépendant de la carnitine [332, 333]. L'utilisation d'huile d'olive a également eu la conséquence de diminuer la quantité d'AGPI n-6. Mais les 'émulsions de seconde génération' (*ClinOleic*<sup>®</sup>) ont donné des résultats cliniques contradictoires [334, 335] invitant à la prudence. La dernière évolution s'est faite avec l'adjonction d'huiles de poisson (*Lipoplus*<sup>®</sup>, *SMOFLipid*<sup>®</sup>). En plus d'être très bien tolérées au niveau hépatique, elles possèdent l'avantage de pouvoir potentiellement moduler l'inflammation en orientant les prostaglandines vers des dérivés anti-inflammatoires [336]. Ce dernier point est d'un intérêt tout particulier ici puisque l'un des objectifs de nos travaux est de pouvoir réduire le processus inflammatoire hépatique. Cet argument nous a orientés sur la possibilité d'utiliser la solution de lipides *Omegaven*<sup>®</sup>, enrichie en huiles de poisson et contenant davantage d'AGPI et d'acides gras mono-insaturés de la famille n-3, afin de réduire l'effet pro-inflammatoire du 4-HNE.

### *Évaluation de la peroxydabilité de l'émulsion Omegaven® in vitro*

Dans cette partie du projet, nous nous sommes intéressés non seulement à la génération de molécules oxydantes (produit) mais également à l'impact de l'exposition à la lumière sur la concentration et la nature de lipides disponibles en tant que substrats d'oxydation.

Comme dans l'étude précédente, les niveaux de 4-HNE et de peroxyde d'hydrogène ont été déterminés dans une NP contenant une solution *Intralipid20%*®. Cependant, avec des acides gras différents, il était important de discriminer l'oxydation des AGPI n-6 et de celle des n-3 en introduisant un marqueur de peroxydation lipidique propre à ces derniers. Le 4-HHE, issu de la peroxydation des AGPI n-3 tels que l'acide  $\alpha$ -linoléique ou docosahexaénoïque a donc été mesuré.

Nous avons pu mettre en évidence que la nature et la concentration d'hydroxy-alkénals différaient en fonction de l'émulsion lipidique utilisée. Les niveaux de 4-HNE mesurés étaient plus bas dans l'émulsion *Omegaven*® que dans la solution d'*Intralipid20%*®, très probablement du fait de la moindre abondance en AGPI n-6. Réciproquement, des concentrations de 4-HHE plus élevées ont été mesurées dans les solutions de NP contenant l'*Omegaven*®, du fait de leur richesse en acides gras n-3. Cependant, même si les deux émulsions génèrent des profils oxydants dissemblables, les concentrations en aldéhydes augmentent sous exposition lumineuse.

Nos résultats ont également montré que l'ajout de multivitamines dans les émulsions lipidiques induit également un effet pro-oxydant. Les concentrations des acides gras des deux émulsions sont par ailleurs significativement plus basses dans le mélange MV-LIP exposé à la lumière. Ces données sont en accord avec les niveaux d'hydroxy-alkénals, plus élevés avec ce mélange. Grâce à ces résultats, nous avons pu calculer un index d'oxydation des acides gras afin de déterminer l'émulsion la plus sensible et nous avons montré que l'émulsion *Omegaven*® générait plus d'hydroxy-alkénals par acide gras. Nos données sont d'ailleurs en accord avec d'autres travaux qui ont aussi mis l'accent sur



la plus grande sensibilité des acides gras n-3 à la peroxydation [337]. Cependant, la conclusion de cette étude *in vitro* est qu'une émulsion lipidique enrichie en AGPI n-3 génère moins de 4-HNE en absolu et en proportion. Il en va différemment du 4-HHE qui est produit en concentration beaucoup plus élevées que le 4-HNE.

Nous avons évoqué ici la peroxydabilité des émulsions lipidiques dans le contexte d'une NP. Nos travaux se sont basés sur les niveaux d'aldéhydes détectés puis mesurés. Cependant, les concentrations rapportées pourraient ne pas être totalement représentatives de la réalité de la peroxydation affectant les lipides. En effet, comme mentionné précédemment dans ce manuscrit, les aldéhydes peuvent réagir en solution avec d'autres molécules et en particulier avec les acides aminés présents dans la solution de TPN. La formation de complexes HNE-Cys, HNE-Lys et HNE-His est ici tout à fait envisageable et cet aspect devra être considéré dans le cadre de prochaines études.

### ***Omegaven<sup>®</sup> : Une émulsion aux propriétés anti-oxydantes?***

Les effets biologiques de l'émulsion lipidique *Omegaven<sup>®</sup>* sur le stress oxydant évalué avec les marqueurs d'oxydation choisis initialement, ont été investigués. L'administration d'acides gras n-3 s'est avérée bénéfique chez des patients diabétiques avec notamment, une augmentation d'activité des systèmes de la glutathion peroxydase [338]. D'autres travaux ont constaté sur un modèle de rats Wistar hypertendus, une augmentation de l'activité du système de Cu/Zn SOD accompagnée d'une diminution des marqueurs de peroxydation lipidique de type *thiobarbituric acid reactive substance* (TBARS) [339]. Même si notre étude est dans un contexte très différent, nos résultats avec une infusion intraveineuse montrent la même tendance puisque le potentiel redox hépatique du glutathion est significativement plus réduit. En comparant avec des études utilisant le même modèle animal, il est intéressant de constater que la valeur de potentiel redox obtenu est comparable à la valeur de celui mesuré chez des animaux du même âge n'ayant subi aucune manipulation [340]. Les niveaux hépatiques de glutathion oxydé sont statistiquement plus bas. Une étude publiée en 2003 a d'ailleurs montré qu'au niveau hépatique, les AGPI n-3 avait la faculté d'activer le système de la glutathion réductase

cytosolique; ceci pourrait expliquer la baisse des concentrations en glutathion oxydé [341]. D'autres travaux démontrent une modulation des marqueurs de peroxydation lipidique en relation avec une administration d'AGPI n-3 [338]. De façon surprenante, nos résultats ne montrent pas de différence significative dans les niveaux hépatiques des F<sub>2α</sub>-isoprostanes, même s'ils indiquent une tendance à une diminution. Le pouvoir statistique de l'analyse reste toutefois un facteur à prendre en compte du fait de son manque de puissance (1-β = 18%). Il est probable qu'une augmentation du nombre d'animaux inclus dans l'étude aurait permis d'observer une diminution significative des niveaux de F<sub>2α</sub>-isoprostanes hépatiques.

### ***Omegaven<sup>®</sup> modulateur de l'inflammation hépatique***

Nos résultats ont mis en évidence une diminution hépatique de la transcription des gènes pro-inflammatoires du TNF-α et d'IL-1 chez les animaux ayant reçu la NP avec Omegaven<sup>®</sup>. Au regard de la littérature, nos données sont en accord avec d'autres publications montrant un effet anti-inflammatoire des AGPI n-3 sur la production par des macrophages et des hépatocytes, de cytokines pro-inflammatoires [342]. Ceci peut être lié aux plus faibles concentrations de 4-HNE mesurées dans la NP, d'autant que cet aldéhyde est connu pour activer la voie du NFκB [265]. Les concentrations plus faibles de 4-HNE dans la NP se répercutent par de plus faibles concentrations hépatiques, reflétées par les niveaux d'adduits GS-HNE.

Les concentrations hépatiques de GS-HHE sont quant à eux augmentées et sont probablement associées aux plus grandes concentrations de 4-HHE présentes dans les solutions avec Omegaven<sup>®</sup>. Des études réalisées sur cet aldéhyde démontrent une capacité à également activer le NFκB [121, 197] sans toutefois qu'un effet pro-inflammatoire ait encore été montré. Cette apparente contradiction pourrait être expliquée par la génération de produits d'oxydation des AGPI n-3 possédant une activité anti-inflammatoire [336, 343].

De nombreux travaux se sont attardés sur le fait qu'une consommation régulière d'AGPI n-3 était associée à une diminution de l'inflammation *in vivo* [344]. Les deux

acides gras les plus abondants dans les huiles de poissons, à savoir l'acide eicosapentaénoïque (communément abrégé en EPA) et l'acide docosahexaénoïque (communément abrégé en DHA) ont d'ailleurs montré leur capacité *in vitro* (cultures primaires d'hépatocytes et de macrophages [342] ) et *in vivo* à réduire l'inflammation [345]. Le DHA semble être la molécule la plus prometteuse en termes d'effets bénéfiques, et plusieurs données ont fait état d'une capacité à inhiber la translocation du NFκB dans plusieurs types cellulaires, et donc inhiber le développement d'un mécanisme inflammatoire [346-350]. Le mécanisme d'action moléculaire n'est toutefois pas encore clairement établi et ce n'est que depuis quelques années que l'on s'intéresse aux sous-produits du DHA. Son oxydation enzymatique par les lipoxgénases génère des protectines et resolvines, molécules à potentiel anti-inflammatoire reconnu [336, 351]. Son oxydation radicalaire génère des espèces regroupées sous le terme de neuroprostanes [134]. Plus précisément, l'activité biologique de la classe A<sub>4</sub>/J<sub>4</sub> N<sub>p</sub> a été investiguée en 2008 sur des macrophages et sa propriété d'inhibition de l'expression des cyclooxygénases de type 2 a été mise en évidence. Plus en amont, l'inhibition de la voie du NFκB a également pu être montrée [343]. Il semble donc raisonnable de penser que l'absence d'un effet pro-inflammatoire du 4-HHE soit associée à l'activité biologique de ces molécules.

Il est toutefois important de ne pas exclure l'effet inhérent au DHA lui-même. Le mécanisme d'action complet n'est pas encore élucidé et l'activité propre de cet acide gras pourrait également être une donnée importante dans la compréhension du mécanisme anti-inflammatoire véhiculé par les AGPI n-3. Il faut également préciser que les huiles de poisson composant *Omegaven*<sup>®</sup> mais aussi d'autres émulsions (*SMOF lipid*<sup>®</sup>) ne contiennent pas uniquement du DHA et de l'EPA. Elles possèdent en effet également des concentrations d'α-tocophérol jusqu'à 10 fois supérieures à ce qu'on trouve dans *Intralipid*<sup>®</sup>. Les effets d'une telle augmentation de vitamine E reste à investiguer.

Nos résultats nous ont donc permis de mettre en évidence une plus grande susceptibilité à la peroxydation de l'émulsion lipidique *Omegaven*<sup>®</sup> par rapport à l'émulsion *Intralipid20%*<sup>®</sup>. Cette solution présente l'avantage de générer moins de 4-HNE ce qui pourrait être en lien avec la baisse du niveau de transcription des gènes pro-

inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-1. En revanche le fait que l'augmentation hépatique du 4-HHE ne déclenche pas d'activation du processus inflammatoire indique que d'autres mécanismes doivent entrer en jeu. L'oxydation des AGPI n-3 et la formation de molécules telles que les protectines, resolvines ou neuroprostanes pourraient être responsables de ces effets bénéfiques. D'autres expériences sont nécessaires pour étudier et discriminer le rôle de ces différents acteurs et en comprendre la synergie d'action globale.

### 3. STRESS OXYDANT ET SUPPLÉMENTATION DE LA NP EN PEPTIDES

En modifiant la composition de l'émulsion lipidique, nos travaux ont permis de contourner le problème de la génération de 4-HNE en abaissant les concentrations de substrat potentiellement peroxydable. Dans un autre registre, nous avons travaillé sur la possibilité d'en réduire la production en adjuvant à la NP des molécules susceptibles de réduire l'oxydation des solutions nutritives.

De très nombreux travaux ont été effectués sur la supplémentation en composés variés dans la NP. Dans les premiers temps, ils visaient le plus souvent à prévenir les carences rencontrées chez l'enfant prématuré, comme dans le cas de l'addition de carnitine [352, 353]. La mise en évidence de l'importance du stress oxydant dans le développement des complications observées chez le prématuré a été déterminante dans l'orientation qui a suivi. Plusieurs études se sont donc focalisées, avec plus ou moins de réussite, sur l'ajout de molécules susceptibles de contrer le stress oxydant *in vivo* ou du moins susceptibles de stimuler la synthèse de nouvelles défenses anti-oxydantes. L'une d'entre elles est la cystéine, l'un des 3 acides aminés composant le glutathion et portant le groupement thiol réactif. La cystathionase catalysant la synthèse endogène de cystéine à partir de la méthionine présente une faible activité [354]. L'ajout de quantités importantes de méthionine devait permettre de compenser le défaut d'activité de l'enzyme chez les prématurés. Cependant, le développement d'une hépato-toxicité susceptible d'induire une réduction du débit biliaire impliquée dans la cholestase intra-hépatique a rapidement éliminé cette approche [355]. Par ailleurs, l'emploi de la cystéine pose un problème en

raison de son instabilité et sa propension à se dimériser en cystine insoluble dans les solutions de NP [39]. D'autres travaux ont utilisé la N-acétylcystéine sur un modèle de porcelet recevant une nutrition parentérale [356]. Les résultats restent toutefois mitigés puisque d'autres études s'accordent sur sa faible biodisponibilité *in vivo* [357-359].

En raison de ces problèmes de toxicité et de biodisponibilité, nous avons développé une approche visant à utiliser des composés à faible potentiel toxique.

Dans l'alimentation du prématuré, l'utilisation de la NP est une étape importante mais temporaire. Le passage à une nutrition entérale doit être initié le plus rapidement possible. La transition d'un mode alimentaire à l'autre se fait progressivement durant une période où l'enfant reçoit la NP et s'initie à une prise de lait de plus en plus importante. Les bienfaits de cette introduction en même temps que la NP sont d'ailleurs reconnus (voir paragraphe 2.3). Nous nous sommes donc particulièrement intéressés aux propriétés anti-oxydantes du lait humain dans le contexte de cette période de transition. Dans le dernier volet de nos travaux, nous nous sommes attachés à étudier l'impact de la consommation de lait humain sur le stress oxydant initié dans notre modèle animal de nutrition parentérale.

### ***Propriétés anti-oxydantes du lait humain***

La capacité antioxydante de deux types de lait, le lait artificiel et le lait humain a été testée sur des cochons d'Inde soumis à un challenge oxydant par infusion de peroxyde d'hydrogène.

L'induction du stress oxydant par le peroxyde d'hydrogène est une méthode utilisée au sein de notre laboratoire et a été plusieurs fois référencée dans la littérature. Elle a pour effet l'augmentation de plusieurs marqueurs de la peroxydation lipidique conjuguée à une déplétion hépatique du glutathion réduit et à l'oxydation du potentiel redox [9]. Ceci s'explique par la mise en place du mécanisme de détoxification des peroxydes faisant intervenir la glutathion peroxydase. L'augmentation des niveaux de F<sub>2α</sub>-isoprostanes, pourrait être le fruit d'une réaction radicalaire induite par la dismutation (ou réaction

d'Haber-Weiss) du  $H_2O_2$  [111]. Il est envisageable que le GS-DHN mesuré dans la bile provienne de la détoxification par glutathionylation du 4-HNE hépatique, réduit par une aldose réductase et exporté dans la bile. L'augmentation de l'aldéhyde, possiblement induite par réaction radicalaire reflète probablement elle aussi une peroxydation lipidique endogène consécutive au développement d'un stress oxydant.

Après induction d'un stress oxydant, nos travaux montrent que le lait humain (HM) ne contrecarre pas l'effet du  $H_2O_2$  sur le système glutathion. Les niveaux des marqueurs de peroxydation lipidique sont toutefois plus bas que dans le groupe ayant reçu le lait artificiel (AM). Ceci suggère que le lait humain, en accord avec des données de la littérature, possède des composés ayant des propriétés anti-radicalaires et qu'il peut potentiellement désactiver les radicaux libres formés [360, 361]. En collaboration avec l'équipe du Dr Friel de l'Université du Manitoba et Dr Tsopmo de l'Université Carleton, nous nous sommes intéressés à des fractions extraites d'un digestat de lait humain pouvant présenter une activité anti-oxydante : les effets de deux peptides (A et B), issus d'un processus mimant la digestion humaine, ont ainsi été étudiés.

### ***Supplémentation de la NP avec les peptides A et B***

Les effets des deux peptides sur l'oxydation des composants de la NP ont d'abord été testés. Nos résultats ont mis en évidence une diminution des concentrations de peroxydes après supplémentation en peptide A sans effet du peptide B. L'analyse de la structure du peptide A, un hexapeptide : **Tyr-Gly-Tyr-Thr-Gly-Ala**, montre dans son organisation spatiale, 2 groupements phénoliques libres latéraux appartenant aux résidus tyrosyles. Le pouvoir antioxydant de ce peptide pourrait donc potentiellement provenir de la présence de ceux-ci, d'autant que des études ont montré la haute capacité des molécules bis phénoliques à trapper les radicaux libres [362, 363]. La production de peroxydes dans la NP étant tributaire d'une réaction radicalaire photoinduite générant de l'oxygène singulet, on peut penser que ce peptide pourrait limiter la propagation de la réaction.

Le peptide B est un hexapeptide de structure **Ile-Ser-Glu-Leu-Gly-Trp** qui n'a pas d'effet sur la production de peroxydes *in vitro*. Ce résultat est relativement surprenant puisque les expériences en collaboration avec l'équipe des Drs Friel et Tsopmo ont mis en évidence un effet anti-radicalaire du peptide par test ORAC. De plus, le peptide présente un résidu tryptophyle en bout de chaîne. Or cet acide aminé possède une activité anti-radicalaire inhérente à sa structure cyclique (donc stabilisé) riche en électrons. Il est donc étonnant de voir que ce peptide ne semble pas avoir d'effet sur la génération de peroxydes dans la NP.

### ***Effets in vivo des peptides A et B***

Les effets des peptides ont alors été testés dans notre modèle animal. Les données obtenues ont partiellement corroboré les résultats des études *in vitro*. La diminution des niveaux de peroxydes dans la NP contenant le peptide A a eu pour conséquence un potentiel redox hépatique plus réduit, résultant de niveaux plus élevés de glutathion réduit. Par conséquent, il semble qu'une moindre quantité de radicaux libres a été formée, entraînant une diminution des marqueurs de peroxydation tels que les niveaux hépatiques de F<sub>2α</sub>-isoprostanés, de GS-HNE et de GS-HHE.

Alors que les travaux *in vitro* n'ont montré aucun effet significatif de l'ajout du peptide B à la NP, la réduction de l'équilibre redox est plutôt surprenante. Les marqueurs de peroxydation sont également plus bas, suggérant une action anti-radicalaire. Selon la structure du peptide B contenant un résidu tryptophyle capable de trapper les radicaux libres [364-367], il est envisageable que le peptide ait été dégradé *in vivo* en libérant son tryptophane, mais sans effet probant *in vitro*.

Nos résultats mettent en lumière une baisse de la transcription des marqueurs pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-1. Ceci est en accord avec des données ayant montré que la consommation de lait humain est associée à une diminution de transcription de IL-1 et IL-8 [368]. Il est probable que ce processus soit médié par le NF $\kappa$ B. Des études [369] ont

montré que l'administration de colostrum bovin et de lait humain provoquait une inhibition de la voie du NF $\kappa$ B. Le mécanisme mis en jeu est basé sur un blocage de la dégradation de la protéine I $\kappa$  $\beta$ , empêchant ainsi la translocation du NF $\kappa$ B dans le noyau [368, 369]. Les composés bioactifs du lait tel que les peptides Tyr-Gly-Tyr-Thr-Gly-Ala et Ile-Ser-Glu-Leu-Gly-Trp pourraient être captés au cours d'un premier passage hépatique et à ce niveau, interagir avec les facteurs de transcription cellulaires et inhiber la voie d'activation du NF $\kappa$ B. Ce processus reste toutefois hypothétique et nécessite des études plus approfondies pour une démonstration sans équivoque.



## CONCLUSION

En conclusion, notre travail a permis de mettre en exergue le rôle primaire du stress oxydant dans la genèse d'une inflammation hépatique chez les enfants prématurés placés sous nutrition parentérale ainsi que les voies de signalisation mises en jeu. Le stress oxydant que nous avons qualifié d'exogène, est directement imputable à la peroxydation lipidique touchant l'émulsion lipidique en générant du 4-HNE. Nos résultats suggèrent que l'infusion continue de cet aldéhyde est responsable du déclenchement d'un processus inflammatoire hépatique véhiculé par activation du NFκB.

Nos travaux ont également permis de démontrer qu'en dehors de la photoprotection des solutions, les formulations et recommandations actuelles visant à réduire la peroxydation lipidique ne fonctionnent pas. Les multivitamines, loin de protéger l'émulsion lipidique provoquent une augmentation des concentrations d'aldéhydes dans la NP qui se répercute au niveau hépatique par une modulation des marqueurs du stress oxydant. Nos travaux suggèrent également que le processus inflammatoire hépatique mis en évidence par l'augmentation des transcrits de cytokines pro-inflammatoires est la conséquence de l'augmentation des concentrations de 4-HNE dans le foie. Ces niveaux plus élevés sembleraient provoquer une dérégulation de la voie du NFκB, se répercutant par une activation nucléaire des gènes du TNF-α et de IL-1.

Une modulation du stress oxydant et de l'inflammation hépatique a été mise en évidence grâce à l'utilisation de solutions riches en AGPI n-3. L'addition de peptides à potentiel antioxydant semble également être une voie alternative crédible à la photoprotection des solutions de nutrition parentérale.

Néanmoins, des études plus approfondies restent nécessaires afin de définir le rôle des différentes molécules oxydantes infusées. Cependant notre modèle arrive à l'une de ses limites : étant injectés ensemble, il est en effet impossible de discriminer l'effet de chaque molécule oxydante. Soumettre des animaux aux composantes isolées pourrait permettre de comprendre l'impact d'un stress oxydant exogène sur la fonction hépatique.

## **PERSPECTIVES**

L'étude des solutions de nutrition parentérale a conduit depuis plusieurs décennies à la mise en œuvre de tentatives d'amélioration de la qualité nutritive. Avec l'avancée de la compréhension des mécanismes déficients chez le nouveau-né prématuré, l'adjonction à la NP de molécules susceptibles de réduire les lésions oxydantes est apparue comme une réponse possible au stress oxydant. L'une des approches envisageables serait de stimuler le système de défense antioxydant endogène en stimulant la synthèse de glutathion.

En se basant sur l'immaturation des systèmes de défense antioxydant, et plus particulièrement sur le défaut d'activité de systèmes enzymatiques nécessaires à la synthèse du glutathion, certaines études ont été menées dans le but d'augmenter, dans la NP, la concentration de précurseurs de la synthèse *in vivo* du GSH.

L'utilisation de L-cystéine dans la NP permet de réduire les quantités de méthionine, et par conséquent de limiter l'hépatotoxicité. Cependant, même si la supplémentation de chlorhydrate de cystéine semble augmenter la rétention azotée et les niveaux de cystéine plasmatique [370], la stabilité même de la molécule en solution reste toutefois sujette à caution. Du fait de sa fonction thiol, la cystéine est susceptible de s'oxyder pour former une molécule de cystine qui précipite en solution. Par ailleurs, la cystéine HCL acidifie le pH de la NP. Ceci entraîne une meilleure solubilité du calcium et du phosphate, mais un pH acidifié introduit une nouvelle contrainte en termes d'interaction médicamenteuse. L'administration de substances alcalines telles que les aciclovir<sup>®</sup>, ganciclovir<sup>®</sup> ou sulfamidés avec une NP à pH acide conduit à des risques de précipitation [371].

Un autre moyen de stimuler la synthèse du glutathion pourrait être de passer par la translocation de facteur de transcription susceptible d'aller activer les gènes *Antioxydant Response Element* (ARE), responsables notamment de la synthèse du GSH [372]. L'activation du facteur de transcription Nrf2 pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante. De plus, nos études ont permis de mettre en évidence la capacité des AGPI n-3 à moduler le stress oxydant et le processus d'activation inflammatoire. Il faut cependant noter que certains travaux ont également montré que les produits d'oxydation des AGPI n-3

étaient susceptibles d'activer Nrf2 en interagissant avec son inhibiteur Keap 1 [373], ce qui constituerait un autre effet bénéfique des AGPI n-3. Il pourrait être envisageable de tester sur un modèle animal une NP enrichie en molécules telles que les résolvines et protectines, susceptibles d'activer la synthèse de glutathion par activation de Nrf2.

Enfin, dans la lignée des thérapies antioxydantes, nos résultats semblent apporter des solutions intéressantes avec l'adjonction de peptides provenant du lait humain. Nos travaux menés sur un modèle animal n'ont cependant pas adressé la question de leur biodisponibilité ni de leur seuil toxicologique qui sont encore inconnus. Ces peptides présentent toutefois un axe de recherche potentiel de thérapie antioxydante tout à fait intéressant et pertinent.

De nombreuses voies sont donc potentiellement encore explorables; elles passent cependant toutes par une meilleure compréhension des mécanismes associés au stress oxydant et à l'induction d'une inflammation par la nutrition parentérale.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Weber, C., et al., *Mortality and morbidity in extremely preterm infants (22 to 26 weeks of gestation): Austria 1999-2001*. Wien Klin Wochenschr, 2005. **117**(21-22): p. 740-6.
2. Steer, P., *The epidemiology of preterm labour*. BJOG, 2005. **112** Suppl 1: p. 1-3.
3. Neu, J., *Gastrointestinal development and meeting the nutritional needs of premature infants*. Am J Clin Nutr, 2007. **85**(2): p. 629S-634S.
4. Piedboeuf, B., et al., *Total parenteral nutrition in the newborn infant: energy substrates and respiratory gas exchange*. J Pediatr, 1991. **118**(1): p. 97-102.
5. Strunk, T., et al., *Innate immunity in human newborn infants: prematurity means more than immaturity*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2011. **24**(1): p. 25-31.
6. Chessex, P., et al., *In preterm neonates, is the risk of developing bronchopulmonary dysplasia influenced by the failure to protect total parenteral nutrition from exposure to ambient light?* J Pediatr, 2007. **151**(2): p. 213-4.
7. Farstad, T., et al., *Bronchopulmonary dysplasia - prevalence, severity and predictive factors in a national cohort of extremely premature infants*. Acta Paediatr, 2011. **100**(1): p. 53-8.
8. Kinsella, J.P., A. Greenough, and S.H. Abman, *Bronchopulmonary dysplasia*. Lancet, 2006. **367**(9520): p. 1421-31.
9. Chessex, P., et al., *Parenteral multivitamin supplementation induces both oxidant and antioxidant responses in the liver of newborn guinea pigs*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2001. **32**(3): p. 316-21.
10. Chou, Y.H., et al., *Total parenteral nutrition-associated cholestasis in infants: clinical and liver histologic studies*. Zhonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi, 1993. **34**(4): p. 264-71.
11. Gura, K.M., et al., *Reversal of parenteral nutrition-associated liver disease in two infants with short bowel syndrome using parenteral fish oil: implications for future management*. Pediatrics, 2006. **118**(1): p. e197-201.
12. Saugstad, O.D., *Oxidative stress in the newborn--a 30-year perspective*. Biol Neonate, 2005. **88**(3): p. 228-36.
13. McElroy, M.C., A.D. Postle, and F.J. Kelly, *Catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities of lung and liver during human development*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1117**(2): p. 153-8.
14. Frank, L. and I.R. Sosenko, *Prenatal development of lung antioxidant enzymes in four species*. J Pediatr, 1987. **110**(1): p. 106-10.
15. Frank, L. and I.R. Sosenko, *Development of lung antioxidant enzyme system in late gestation: possible implications for the prematurely born infant*. J Pediatr, 1987. **110**(1): p. 9-14.

16. Esterbauer, H., R.J. Schaur, and H. Zollner, *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. Free Radic Biol Med, 1991. **11**(1): p. 81-128.
17. Pryor, W.A. and N.A. Porter, *Suggested mechanisms for the production of 4-hydroxy-2-nonenal from the autoxidation of polyunsaturated fatty acids*. Free Radic Biol Med, 1990. **8**(6): p. 541-3.
18. Hamilton, B.E., J.A. Martin, and S.J. Ventura, *Births: preliminary data for 2005*. Natl Vital Stat Rep, 2006. **55**(11): p. 1-18.
19. Slattery, M.M. and J.J. Morrison, *Preterm delivery*. Lancet, 2002. **360**(9344): p. 1489-97.
20. Goldenberg, R.L., et al., *Epidemiology and causes of preterm birth*. Lancet, 2008. **371**(9606): p. 75-84.
21. Romero, R., et al., *The preterm parturition syndrome*. BJOG, 2006. **113** Suppl 3: p. 17-42.
22. Sirinyan, M., et al., *Hyperoxic exposure leads to nitrative stress and ensuing microvascular degeneration and diminished brain mass and function in the immature subject*. Stroke; a journal of cerebral circulation, 2006. **37**(11): p. 2807-15.
23. Montgomery, R.K., A.E. Mulberg, and R.J. Grand, *Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress*. Gastroenterology, 1999. **116**(3): p. 702-31.
24. Duluc, I., et al., *Fetal endoderm primarily holds the temporal and positional information required for mammalian intestinal development*. J Cell Biol, 1994. **126**(1): p. 211-21.
25. Kedinger, M., et al., *Fetal gut mesenchyme induces differentiation of cultured intestinal endodermal and crypt cells*. Dev Biol, 1986. **113**(2): p. 474-83.
26. Lefton-Greif, M.A. and S.A. McGrath-Morrow, *Deglutition and respiration: development, coordination, and practical implications*. Semin Speech Lang, 2007. **28**(3): p. 166-79.
27. Sase, M., et al., *Sonographic evaluation of antepartum development of fetal gastric motility*. Ultrasound Obstet Gynecol, 1999. **13**(5): p. 323-6.
28. McGuire, W., G. Henderson, and P.W. Fowlie, *Feeding the preterm infant*. BMJ, 2004. **329**(7476): p. 1227-30.
29. Pauly, D.F., et al., *Complete correction of acid alpha-glucosidase deficiency in Pompe disease fibroblasts in vitro, and lysosomally targeted expression in neonatal rat cardiac and skeletal muscle*. Gene Ther, 1998. **5**(4): p. 473-80.
30. Baksi, K., *Effects of neonatal undernutrition on small intestinal dipeptidase(s) activity*. Indian J Exp Biol, 1979. **17**(10): p. 1107-11.



31. Lindberg, T. and B.W. Karlsson, *Changes in intestinal dipeptidase activities during fetal and neonatal development of the pig as related to the ultrastructure of mucosal cells*. Gastroenterology, 1970. **59**(2): p. 247-56.
32. Weaver, L.T., M.F. Laker, and R. Nelson, *Neonatal intestinal lactase activity*. Arch Dis Child, 1986. **61**(9): p. 896-9.
33. Antonowicz, I. and E. Lebenthal, *Developmental pattern of small intestinal enterokinase and disaccharidase activities in the human fetus*. Gastroenterology, 1977. **72**(6): p. 1299-303.
34. Kitamoto, Y., et al., *Enterokinase, the initiator of intestinal digestion, is a mosaic protease composed of a distinctive assortment of domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(16): p. 7588-92.
35. Frank, L., *Developmental aspects of experimental pulmonary oxygen toxicity*. Free Radic Biol Med, 1991. **11**(5): p. 463-94.
36. Lavoie, J.C. and P. Chessex, *Development of glutathione synthesis and gamma-glutamyltranspeptidase activities in tissues from newborn infants*. Free Radic Biol Med, 1998. **24**(6): p. 994-1001.
37. Grigg, J., A. Barber, and M. Silverman, *Bronchoalveolar lavage fluid glutathione in intubated premature infants*. Arch Dis Child, 1993. **69**(1 Spec No): p. 49-51.
38. Jalabert, A., et al., *Lipid peroxidation in all-in-one admixtures for preterm neonates: impact of amount of lipid, type of lipid emulsion and delivery condition*. Acta Paediatr, 2011.
39. Heird, W.C., *Amino acids in pediatric and neonatal nutrition*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 1998. **1**(1): p. 73-8.
40. Heird, W.C. and M.R. Gomez, *Parenteral nutrition in low-birth-weight infants*. Annu Rev Nutr, 1996. **16**: p. 471-99.
41. Bresson, J.L., et al., *Energy substrate utilization in infants receiving total parenteral nutrition with different glucose to fat ratios*. Pediatr Res, 1989. **25**(6): p. 645-8.
42. Decaro, M.H. and N.E. Vain, *Hyperglycaemia in preterm neonates: what to know, what to do*. Early human development, 2011. **87 Suppl 1**: p. S19-22.
43. Brooke, O.G., *Nutritional requirements of low and very low birthweight infants*. Annual review of nutrition, 1987. **7**: p. 91-116.
44. Hardy, G. and M. Puzovic, *Formulation, stability, and administration of parenteral nutrition with new lipid emulsions*. Nutr Clin Pract, 2009. **24**(5): p. 616-25.
45. Meisel, J.A., et al., *Comparison of 5 intravenous lipid emulsions and their effects on hepatic steatosis in a murine model*. Journal of pediatric surgery, 2011. **46**(4): p. 666-73.
46. Greene, H.L., et al., *Guidelines for the use of vitamins, trace elements, calcium, magnesium, and phosphorus in infants and children receiving total parenteral nutrition: report of the Subcommittee on Pediatric Parenteral Nutrient*

- Requirements from the Committee on Clinical Practice Issues of the American Society for Clinical Nutrition. The American journal of clinical nutrition, 1988. 48(5): p. 1324-42.*
47. Rennie, J.M. and A.W. Kelsall, *Vitamin K prophylaxis in the newborn--again. Archives of disease in childhood, 1994. 70(3): p. 248-51.*
  48. Zlotkin, S.H. and B.E. Buchanan, *Meeting zinc and copper intake requirements in the parenterally fed preterm and full-term infant. The Journal of pediatrics, 1983. 103(3): p. 441-6.*
  49. Staunton, M. and D.M. Phelan, *Manganese toxicity in a patient with cholestasis receiving total parenteral nutrition. Anaesthesia, 1995. 50(7): p. 665.*
  50. Hambidge, K.M., et al., *Plasma manganese concentrations in infants and children receiving parenteral nutrition. JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition, 1989. 13(2): p. 168-71.*
  51. Delange, F., et al., *Increased risk of primary hypothyroidism in preterm infants. The Journal of pediatrics, 1984. 105(3): p. 462-9.*
  52. Duhamel, J.F., et al., *[Vitamin B2 deficiency and total parenteral nutrition]. Arch Fr Pediatr, 1979. 36(4): p. 342-6.*
  53. Navarro, J., et al., *[Supply of vitamin A, E, C, B 12 and folates during total parenteral nutrition in pediatrics]. Arch Fr Pediatr, 1979. 36(2): p. 121-33.*
  54. Newell, S.J., *Enteral feeding of the micropremie. Clinics in perinatology, 2000. 27(1): p. 221-34, viii.*
  55. Underdown, B.J. and J.M. Schiff, *Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. Annu Rev Immunol, 1986. 4: p. 389-417.*
  56. Renegar, K.B., et al., *Impairment of mucosal immunity by total parenteral nutrition: requirement for IgA in murine nasotracheal anti-influenza immunity. J Immunol, 2001. 166(2): p. 819-25.*
  57. Gotsch, F., et al., *The fetal inflammatory response syndrome. Clin Obstet Gynecol, 2007. 50(3): p. 652-83.*
  58. Tyson, J.E. and K.A. Kennedy, *Minimal enteral nutrition for promoting feeding tolerance and preventing morbidity in parenterally fed infants. Cochrane Database Syst Rev, 2000(2): p. CD000504.*
  59. Ziegler, E.E. and S.J. Carlson, *Early nutrition of very low birth weight infants. J Matern Fetal Neonatal Med, 2009. 22(3): p. 191-7.*
  60. Tyson, J.E. and K.A. Kennedy, *Trophic feedings for parenterally fed infants. Cochrane Database Syst Rev, 2005(3): p. CD000504.*
  61. Lucas, A., S.R. Bloom, and A. Aynsley-Green, *Gut hormones and 'minimal enteral feeding'. Acta Paediatr Scand, 1986. 75(5): p. 719-23.*

62. Karagianni, P., et al., *Early versus delayed minimal enteral feeding and risk for necrotizing enterocolitis in preterm growth-restricted infants with abnormal antenatal Doppler results*. Am J Perinatol, 2010. **27**(5): p. 367-73.
63. Sisk, P.M., et al., *Early human milk feeding is associated with a lower risk of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants*. J Perinatol, 2007. **27**(7): p. 428-33.
64. Sullivan, S., et al., *An exclusively human milk-based diet is associated with a lower rate of necrotizing enterocolitis than a diet of human milk and bovine milk-based products*. J Pediatr, 2010. **156**(4): p. 562-7 e1.
65. Hirai, C., et al., *Trophic effect of multiple growth factors in amniotic fluid or human milk on cultured human fetal small intestinal cells*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2002. **34**(5): p. 524-8.
66. Lawrence, R.M. and R.A. Lawrence, *Breastfeeding: more than just good nutrition*. Pediatrics in review / American Academy of Pediatrics, 2011. **32**(7): p. 267-80.
67. Weaver, L.T., et al., *Human milk IgA concentrations during the first year of lactation*. Arch Dis Child, 1998. **78**(3): p. 235-9.
68. Brock, J.H., *Lactoferrin in human milk: its role in iron absorption and protection against enteric infection in the newborn infant*. Arch Dis Child, 1980. **55**(6): p. 417-21.
69. Giugliano, L.G., et al., *Free secretory component and lactoferrin of human milk inhibit the adhesion of enterotoxigenic Escherichia coli*. J Med Microbiol, 1995. **42**(1): p. 3-9.
70. Berkhout, B., et al., *The antiviral activity of the milk protein lactoferrin against the human immunodeficiency virus type 1*. Biometals, 2004. **17**(3): p. 291-4.
71. Hanson, L.A., et al., *Anti-inflammatory capacities of human milk: lactoferrin and secretory IgA inhibit endotoxin-induced cytokine release*. Adv Exp Med Biol, 1995. **371A**: p. 669-72.
72. German, J.B., et al., *Human milk oligosaccharides: evolution, structures and bioselectivity as substrates for intestinal bacteria*. Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program, 2008. **62**: p. 205-18; discussion 218-22.
73. Kuntz, S., S. Rudloff, and C. Kunz, *Oligosaccharides from human milk influence growth-related characteristics of intestinally transformed and non-transformed intestinal cells*. Br J Nutr, 2008. **99**(3): p. 462-71.
74. Jarmolowska, B., et al., *Changes of beta-casomorphin content in human milk during lactation*. Peptides, 2007. **28**(10): p. 1982-6.
75. Aycicek, A., et al., *Breast milk provides better antioxidant power than does formula*. Nutrition, 2006. **22**(6): p. 616-9.
76. Allwood, M.C. and M.C. Kearney, *Compatibility and stability of additives in parenteral nutrition admixtures*. Nutrition, 1998. **14**(9): p. 697-706.

77. Estebe, J.P. and Y. Malledant, *Fat embolism after lipid emulsion infusion*. Lancet, 1991. **337**(8742): p. 673.
78. McCracken, M., *Fat embolism after lipid emulsion infusion*. Lancet, 1991. **337**(8747): p. 983.
79. Skouroliakou, M., et al., *Physicochemical stability of parenteral nutrition supplied as all-in-one for neonates*. JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition, 2008. **32**(2): p. 201-9.
80. Edwards, A.M. and E. Silva, *Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids*. J Photochem Photobiol B, 2001. **63**(1-3): p. 126-31.
81. Hustad, S., et al., *Riboflavin, flavin mononucleotide, and flavin adenine dinucleotide in human plasma and erythrocytes at baseline and after low-dose riboflavin supplementation*. Clin Chem, 2002. **48**(9): p. 1571-7.
82. Choe, E. and D.B. Min, *Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2006. **46**(1): p. 1-22.
83. Kramarenko, G.G., et al., *Ascorbate reacts with singlet oxygen to produce hydrogen peroxide*. Photochem Photobiol, 2006. **82**(6): p. 1634-7.
84. Jung, M.Y., K.H. Lee, and S.Y. Kim, *Riboflavin-sensitized photochemical changes in beta-lactoglobulin in an aqueous buffer solution as affected by ascorbic acid*. Journal of agricultural and food chemistry, 2000. **48**(9): p. 3847-50.
85. Cardoso, D.R., K. Olsen, and L.H. Skibsted, *Mechanism of deactivation of triplet-excited riboflavin by ascorbate, carotenoids, and tocopherols in homogeneous and heterogeneous aqueous food model systems*. Journal of agricultural and food chemistry, 2007. **55**(15): p. 6285-91.
86. Buettner, G.R. and F.Q. Schafer, *Free radicals, oxidants, and antioxidants*. Teratology, 2000. **62**(4): p. 234.
87. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2007. **39**(1): p. 44-84.
88. Gibbons, E., et al., *Degradation of dehydroascorbic acid in parenteral nutrition mixtures*. J Pharm Biomed Anal, 2001. **25**(3-4): p. 605-11.
89. Poli, G. and R.J. Schaur, *4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress*. IUBMB Life, 2000. **50**(4-5): p. 315-21.
90. Silvers, K.M., B.A. Darlow, and C.C. Winterbourn, *Lipid peroxide and hydrogen peroxide formation in parenteral nutrition solutions containing multivitamins*. JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition, 2001. **25**(1): p. 14-7.
91. Silvers, K.M., et al., *Limiting light-induced lipid peroxidation and vitamin loss in infant parenteral nutrition by adding multivitamin preparations to Intralipid*. Acta Paediatr, 2001. **90**(3): p. 242-9.

92. Koletzko, B., et al., *I. Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR)*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2005. **41 Suppl 2**: p. S1-87.
93. A.S.P.E.N., *Guidelines for the use of parenteral and enteral nutrition in adult and pediatric patients* 2002, Silver Spring, Md.: A.S.P.E.N. x, 138 p.
94. Kljuchnikov, S., et al., *Haemolysis in adult and neonatal erythrocytes caused by autoxidation of lipid emulsion (Intralipid)*. Acta Paediatr, 1993. **82**(4): p. 348-51.
95. Lavoie, J.C., T. Rouleau, and P. Chessex, *Interaction between ascorbate and light-exposed riboflavin induces lung remodeling*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **311**(2): p. 634-9.
96. Lavoie, J.C., et al., *Photoprotection prevents TPN-induced lung procollagen mRNA in newborn guinea pigs*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(4): p. 512-20.
97. Lavoie, J.C., et al., *Influence of lung oxidant and antioxidant status on alveolarization: role of light-exposed total parenteral nutrition*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(5): p. 572-7; discussion 570-1.
98. Chessex, P., et al., *Photooxidation of parenteral multivitamins induces hepatic steatosis in a neonatal guinea pig model of intravenous nutrition*. Pediatr Res, 2002. **52**(6): p. 958-63.
99. Lavoie, J.C., et al., *Reduced bile flow associated with parenteral nutrition is independent of oxidant load and parenteral multivitamins*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2005. **41**(1): p. 108-14.
100. Babior, B.M. and R.C. Woodman, *Chronic granulomatous disease*. Semin Hematol, 1990. **27**(3): p. 247-59.
101. Babior, B.M. and J.T. Curnutte, *Chronic granulomatous disease--pieces of a cellular and molecular puzzle*. Blood Rev, 1987. **1**(4): p. 215-8.
102. Sorescu, D., et al., *Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis*. Circulation, 2002. **105**(12): p. 1429-35.
103. Kovacic, P. and R.S. Pozos, *Cell signaling (mechanism and reproductive toxicity): redox chains, radicals, electrons, relays, conduit, electrochemistry, and other medical implications*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2006. **78**(4): p. 333-44.
104. Kovacic, P., et al., *Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships*. Curr Med Chem, 2005. **12**(22): p. 2601-23.
105. Winterbourn, C.C. and D. Metodiewa, *Reaction of superoxide with glutathione and other thiols*. Methods Enzymol, 1995. **251**: p. 81-6.
106. Liochev, S.I. and I. Fridovich, *Superoxide and iron: partners in crime*. IUBMB Life, 1999. **48**(2): p. 157-61.

107. Bielski, B.H., *Fast kinetic studies of dioxygen-derived species and their metal complexes*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1985. **311**(1152): p. 473-82.
108. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts*. Arch Biochem Biophys, 1986. **246**(2): p. 501-14.
109. Pastor, N., et al., *A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding*. J Mol Biol, 2000. **304**(1): p. 55-68.
110. Rae, T.D., et al., *Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase*. Science, 1999. **284**(5415): p. 805-8.
111. Liochev, S.I. and I. Fridovich, *The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view*. Redox Rep, 2002. **7**(1): p. 55-7; author reply 59-60.
112. Ghafourifar, P., et al., *Determination of mitochondrial nitric oxide synthase activity*. Methods Enzymol, 2005. **396**: p. 424-44.
113. Ghafourifar, P. and E. Cadenas, *Mitochondrial nitric oxide synthase*. Trends Pharmacol Sci, 2005. **26**(4): p. 190-5.
114. Bergendi, L., et al., *Chemistry, physiology and pathology of free radicals*. Life Sci, 1999. **65**(18-19): p. 1865-74.
115. Chiueh, C.C., *Neuroprotective properties of nitric oxide*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **890**: p. 301-11.
116. Carr, A.C., M.R. McCall, and B. Frei, *Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(7): p. 1716-23.
117. Sevanian, A. and P. Hochstein, *Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems*. Annual review of nutrition, 1985. **5**: p. 365-90.
118. Sevanian, A. and P. Hochstein, *Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems*. Annu Rev Nutr, 1985. **5**: p. 365-90.
119. Poli, G., et al., *4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest*. Med Res Rev, 2008. **28**(4): p. 569-631.
120. Esterbauer, H., et al., *Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe<sup>2+</sup> in rat liver microsomes*. Biochem J, 1982. **208**(1): p. 129-40.
121. Long, E.K. and M.J. Picklo, Sr., *Trans-4-hydroxy-2-hexenal, a product of n-3 fatty acid peroxidation: make some room HNE*. Free Radic Biol Med, 2010. **49**(1): p. 1-8.
122. Morrow, J.D., et al., *A series of prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(23): p. 9383-7.

123. Yin, H., et al., *Urinary prostaglandin F2alpha is generated from the isoprostane pathway and not the cyclooxygenase in humans*. J Biol Chem, 2007. **282**(1): p. 329-36.
124. Gao, L., et al., *Formation of prostaglandins E2 and D2 via the isoprostane pathway: a mechanism for the generation of bioactive prostaglandins independent of cyclooxygenase*. J Biol Chem, 2003. **278**(31): p. 28479-89.
125. Yin, H., et al., *Mechanisms for the formation of isoprostane endoperoxides from arachidonic acid. "Dioxetane" intermediate versus beta-fragmentation of peroxy radicals*. J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 16720-5.
126. Roberts, L.J., 2nd and G.L. Milne, *Isoprostanes*. Journal of lipid research, 2009. **50 Suppl**: p. S219-23.
127. Morrow, J.D., et al., *Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): p. 10721-5.
128. Morrow, J.D., *The isoprostanes - unique products of arachidonate peroxidation: their role as mediators of oxidant stress*. Curr Pharm Des, 2006. **12**(8): p. 895-902.
129. Brame, C.J., et al., *Identification of extremely reactive gamma-ketoaldehydes (isolevuglandins) as products of the isoprostane pathway and characterization of their lysyl protein adducts*. J Biol Chem, 1999. **274**(19): p. 13139-46.
130. Montine, T.J., et al., *Antioxidants significantly affect the formation of different classes of isoprostanes and neuroprostanes in rat cerebral synaptosomes*. Biochem Pharmacol, 2003. **65**(4): p. 611-7.
131. Musiek, E.S., et al., *Cyclopentenone isoprostanes are novel bioactive products of lipid oxidation which enhance neurodegeneration*. J Neurochem, 2006. **97**(5): p. 1301-13.
132. Musiek, E.S., et al., *Cyclopentenone isoprostanes inhibit the inflammatory response in macrophages*. J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35562-70.
133. Gao, L., et al., *Formation of F-ring isoprostane-like compounds (F3-isoprostanes) in vivo from eicosapentaenoic acid*. J Biol Chem, 2006. **281**(20): p. 14092-9.
134. Roberts, L.J., 2nd, et al., *Formation of isoprostane-like compounds (neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13605-12.
135. Pratico, D., et al., *Local amplification of platelet function by 8-Epi prostaglandin F2alpha is not mediated by thromboxane receptor isoforms*. J Biol Chem, 1996. **271**(25): p. 14916-24.
136. Gao, L., et al., *Formation of F-ring isoprostane-like compounds (F3-isoprostanes) in vivo from eicosapentaenoic acid*. The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(20): p. 14092-9.
137. Cadenas, E., *Basic mechanisms of antioxidant activity*. Biofactors, 1997. **6**(4): p. 391-7.

138. Lavoie, J.C. and P. Chessex, *Gender and maturation affect glutathione status in human neonatal tissues*. Free Radic Biol Med, 1997. **23**(4): p. 648-57.
139. Schafer, F.Q. and G.R. Buettner, *Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple*. Free Radic Biol Med, 2001. **30**(11): p. 1191-212.
140. Fang, Y.Z., S. Yang, and G. Wu, *Free radicals, antioxidants, and nutrition*. Nutrition, 2002. **18**(10): p. 872-9.
141. Boon, P.J., et al., *Glutathione conjugation of 4-hydroxy-trans-2,3-nonenal in the rat in vivo, the isolated perfused liver and erythrocytes*. Toxicol Appl Pharmacol, 1999. **159**(3): p. 214-23.
142. Pastore, A., et al., *Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification*. Clin Chim Acta, 2003. **333**(1): p. 19-39.
143. Manevich, Y. and A.B. Fisher, *Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism*. Free Radic Biol Med, 2005. **38**(11): p. 1422-32.
144. Masella, R., et al., *Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes*. J Nutr Biochem, 2005. **16**(10): p. 577-86.
145. Lei, X.G., *In vivo antioxidant role of glutathione peroxidase: evidence from knockout mice*. Methods Enzymol, 2002. **347**: p. 213-25.
146. Holmgren, A., *Thioredoxin and glutaredoxin systems*. J Biol Chem, 1989. **264**(24): p. 13963-6.
147. Spyrou, G., et al., *Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin*. J Biol Chem, 1997. **272**(5): p. 2936-41.
148. Wassmann, S., K. Wassmann, and G. Nickenig, *Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells*. Hypertension, 2004. **44**(4): p. 381-6.
149. Levine, M., *Vitamin C: turning over a new leaf*. Nutrition, 1989. **5**(6): p. 428.
150. Levine, M., et al., *Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(8): p. 3704-9.
151. Knafo, L., et al., *Association between hydrogen peroxide-dependent byproducts of ascorbic acid and increased hepatic acetyl-CoA carboxylase activity*. Clinical chemistry, 2005. **51**(8): p. 1462-71.
152. Carr, A. and B. Frei, *Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions?* FASEB J, 1999. **13**(9): p. 1007-24.
153. Drevon, C.A., *Absorption, transport and metabolism of vitamin E*. Free Radic Res Commun, 1991. **14**(4): p. 229-46.
154. Feki, M., M. Souissi, and A. Mebazaa, *[Vitamin E: structure, metabolism, and functions]*. Ann Med Interne (Paris), 2001. **152**(6): p. 384-91.



155. Niki, E., *Antioxidants in relation to lipid peroxidation*. Chem Phys Lipids, 1987. **44**(2-4): p. 227-53.
156. Stahl, W. and H. Sies, *Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids*. Diabetes, 1997. **46 Suppl 2**: p. S14-8.
157. Ernster, L., P. Forsmark, and K. Nordenbrand, *The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes: relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles*. Biofactors, 1992. **3**(4): p. 241-8.
158. Chang, W.C., et al., *Cytoprotective effect of reduced glutathione in arsenical-induced endothelial cell injury*. Toxicology, 1991. **69**(1): p. 101-10.
159. Brawn, K. and I. Fridovich, *Superoxide radical and superoxide dismutases: threat and defense*. Acta Physiol Scand Suppl, 1980. **492**: p. 9-18.
160. Borgstahl, G.E., et al., *The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles*. Cell, 1992. **71**(1): p. 107-18.
161. Fridovich, I., *Superoxide radical and superoxide dismutases*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 97-112.
162. Davis, C.A., et al., *Potent anti-tumor effects of an active site mutant of human manganese-superoxide dismutase. Evolutionary conservation of product inhibition*. J Biol Chem, 2004. **279**(13): p. 12769-76.
163. Li, Y., et al., *Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase*. Nat Genet, 1995. **11**(4): p. 376-81.
164. Melov, S., et al., *Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(3): p. 846-51.
165. Petersen, S.V., et al., *Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) binds to type I collagen and protects against oxidative fragmentation*. The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(14): p. 13705-10.
166. Gao, F., et al., *Extracellular superoxide dismutase inhibits inflammation by preventing oxidative fragmentation of hyaluronan*. J Biol Chem, 2008. **283**(10): p. 6058-66.
167. Stocker, R., et al., *Hypochlorous acid impairs endothelium-derived nitric oxide bioactivity through a superoxide-dependent mechanism*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(11): p. 2028-33.
168. Bozzato, R.P., D. Woolley, and D.O. Tinker, *Catalytic properties of the yeast phospholipid transfer protein*. Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire, 1987. **65**(3): p. 203-10.
169. Ho, Y.S., et al., *Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia*. J Biol Chem, 1997. **272**(26): p. 16644-51.

170. Wingler, K., et al., *Gastrointestinal glutathione peroxidase prevents transport of lipid hydroperoxides in CaCo-2 cells*. *Gastroenterology*, 2000. **119**(2): p. 420-30.
171. Wingler, K. and R. Brigelius-Flohe, *Gastrointestinal glutathione peroxidase*. *Biofactors*, 1999. **10**(2-3): p. 245-9.
172. Esworthy, R.S., et al., *Low glutathione peroxidase activity in Gpx1 knockout mice protects jejunum crypts from gamma-irradiation damage*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000. **279**(2): p. G426-36.
173. Ottaviano, F.G., et al., *Regulation of the extracellular antioxidant selenoprotein plasma glutathione peroxidase (GPx-3) in mammalian cells*. *Molecular and cellular biochemistry*, 2009. **327**(1-2): p. 111-26.
174. Voetsch, B., et al., *Promoter polymorphisms in the plasma glutathione peroxidase (GPx-3) gene: a novel risk factor for arterial ischemic stroke among young adults and children*. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 2007. **38**(1): p. 41-9.
175. Bierl, C., et al., *Determinants of human plasma glutathione peroxidase (GPx-3) expression*. *The Journal of biological chemistry*, 2004. **279**(26): p. 26839-45.
176. Maddipati, K.R. and L.J. Marnett, *Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. Purification and properties of a selenium-dependent glutathione peroxidase*. *J Biol Chem*, 1987. **262**(36): p. 17398-403.
177. Roveri, A., et al., *Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(9): p. 6142-6.
178. Roveri, A., et al., *Purification and characterization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from rat testis mitochondrial membranes*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1208**(2): p. 211-21.
179. Pfeifer, H., et al., *Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation*. *FASEB J*, 2001. **15**(7): p. 1236-8.
180. Bacot, S., et al., *Covalent binding of hydroxy-alkenals 4-HDDE, 4-HHE, and 4-HNE to ethanolamine phospholipid subclasses*. *Journal of lipid research*, 2003. **44**(5): p. 917-26.
181. Mannervik, B. and U.H. Danielson, *Glutathione transferases--structure and catalytic activity*. *CRC Crit Rev Biochem*, 1988. **23**(3): p. 283-337.
182. Awasthi, Y.C., R. Sharma, and S.S. Singhal, *Human glutathione S-transferases*. *Int J Biochem*, 1994. **26**(3): p. 295-308.
183. Yang, Y., et al., *Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation. Overexpression of hGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(22): p. 19220-30.

184. Zimniak, L., et al., *Increased resistance to oxidative stress in transfected cultured cells overexpressing glutathione S-transferase mGSTA4-4*. Toxicol Appl Pharmacol, 1997. **143**(1): p. 221-9.
185. Board, P.G. and M.W. Anders, *Human glutathione transferase zeta*. Methods Enzymol, 2005. **401**: p. 61-77.
186. Johansson, A.S. and B. Mannervik, *Human glutathione transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones*. J Biol Chem, 2001. **276**(35): p. 33061-5.
187. Jakobsson, P.J., et al., *Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). A widespread protein superfamily*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(2 Pt 2): p. S20-4.
188. Matsuura, K., et al., *Aldose reductase is a major reductase for isocaproaldehyde, a product of side-chain cleavage of cholesterol, in human and animal adrenal glands*. Archives of biochemistry and biophysics, 1996. **328**(2): p. 265-71.
189. Liu, S.Q., et al., *Identification of the reactive cysteine residue in human placenta aldose reductase*. Biochimica et biophysica acta, 1993. **1164**(3): p. 268-72.
190. Srivastava, S., et al., *Regulation of lens aldose reductase activity by nitric oxide*. Experimental eye research, 2005. **81**(6): p. 664-72.
191. Srivastava, S.K., K.V. Ramana, and A. Bhatnagar, *Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options*. Endocr Rev, 2005. **26**(3): p. 380-92.
192. Crabb, D.W., et al., *Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology*. Proc Nutr Soc, 2004. **63**(1): p. 49-63.
193. Evans, P. and B. Halliwell, *Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **884**: p. 19-40.
194. Broome, J.D. and M.W. Jeng, *Promotion of replication in lymphoid cells by specific thiols and disulfides in vitro. Effects on mouse lymphoma cells in comparison with splenic lymphocytes*. J Exp Med, 1973. **138**(3): p. 574-92.
195. Hamilos, D.L., P. Zelarny, and J.J. Mascali, *Lymphocyte proliferation in glutathione-depleted lymphocytes: direct relationship between glutathione availability and the proliferative response*. Immunopharmacology, 1989. **18**(3): p. 223-35.
196. Choudhary, S., et al., *Cellular lipid peroxidation end-products induce apoptosis in human lens epithelial cells*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(4): p. 360-9.
197. Long, E.K., et al., *Trans-4-hydroxy-2-hexenal is a neurotoxic product of docosahexaenoic (22:6; n-3) acid oxidation*. J Neurochem, 2008. **105**(3): p. 714-24.
198. Shaw, J.P. and I.N. Chou, *Elevation of intracellular glutathione content associated with mitogenic stimulation of quiescent fibroblasts*. J Cell Physiol, 1986. **129**(2): p. 193-8.

199. Cracowski, J.L., *Isoprostanes as a tool to investigate oxidative stress in scleroderma spectrum disorders--advantages and limitations*. Rheumatology (Oxford), 2006. **45**(7): p. 922-3; author reply 923-4.
200. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *The antioxidants of human extracellular fluids*. Arch Biochem Biophys, 1990. **280**(1): p. 1-8.
201. Winterbourn, C.C. and D. Metodiewa, *Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(3-4): p. 322-8.
202. Sohn, J. and J. Rudolph, *Catalytic and chemical competence of regulation of cdc25 phosphatase by oxidation/reduction*. Biochemistry, 2003. **42**(34): p. 10060-70.
203. Little, C. and P.J. O'Brien, *Mechanism of peroxide-inactivation of the sulphhydryl enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Eur J Biochem, 1969. **10**(3): p. 533-8.
204. Goldman, R., et al., *Reduction of phenoxyl radicals by thioredoxin results in selective oxidation of its SH-groups to disulfides. An antioxidant function of thioredoxin*. Biochemistry, 1995. **34**(14): p. 4765-72.
205. Chen, W., M. Wilborn, and J. Rudolph, *Dual-specific Cdc25B phosphatase: in search of the catalytic acid*. Biochemistry, 2000. **39**(35): p. 10781-9.
206. Winterbourn, C.C. and M.B. Hampton, *Thiol chemistry and specificity in redox signaling*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(5): p. 549-61.
207. Forman, H.J., *Reactive oxygen species and alpha,beta-unsaturated aldehydes as second messengers in signal transduction*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1203**: p. 35-44.
208. Forman, H.J., J.M. Fukuto, and M. Torres, *Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **287**(2): p. C246-56.
209. Schauenstein, E., *Autoxidation of polyunsaturated esters in water: chemical structure and biological activity of the products*. Journal of lipid research, 1967. **8**(5): p. 417-28.
210. Selley, M.L., et al., *Determination of the lipid peroxidation product trans-4-hydroxy-2-nonenal in biological samples by high-performance liquid chromatography and combined capillary column gas chromatography-negative-ion chemical ionisation mass spectrometry*. J Chromatogr, 1989. **488**(2): p. 329-40.
211. Koster, J.F., et al., *Comparison of the inactivation of microsomal glucose-6-phosphatase by in situ lipid peroxidation-derived 4-hydroxynonenal and exogenous 4-hydroxynonenal*. Free Radic Res Commun, 1986. **1**(4): p. 273-87.
212. Gueraud, F., et al., *Enantioselective metabolism of (R)- and (S)-4-hydroxy-2-nonenal in rat*. Biofactors, 2005. **24**(1-4): p. 97-104.
213. Uchida, K., et al., *Immunochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in oxidized hepatocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8742-6.

214. Siems, W. and T. Grune, *Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal*. Mol Aspects Med, 2003. **24**(4-5): p. 167-75.
215. Hashimoto, M., et al., *Structural basis of protein-bound endogenous aldehydes. Chemical and immunochemical characterizations of configurational isomers of a 4-hydroxy-2-nonenal-histidine adduct*. J Biol Chem, 2003. **278**(7): p. 5044-51.
216. Petersen, D.R. and J.A. Doorn, *Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(7): p. 937-45.
217. Guichardant, M., et al., *Covalent modifications of aminophospholipids by 4-hydroxynonenal*. Free Radic Biol Med, 1998. **25**(9): p. 1049-56.
218. Amarnath, V., et al., *Pyridoxamine: an extremely potent scavenger of 1,4-dicarbonyls*. Chem Res Toxicol, 2004. **17**(3): p. 410-5.
219. Sowell, J., B. Frei, and J.F. Stevens, *Vitamin C conjugates of genotoxic lipid peroxidation products: structural characterization and detection in human plasma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(52): p. 17964-9.
220. Kowalczyk, P., et al., *Long-chain adducts of trans-4-hydroxy-2-nonenal to DNA bases cause recombination, base substitutions and frameshift mutations in M13 phage*. Mutat Res, 2004. **550**(1-2): p. 33-48.
221. Winter, C.K., H.J. Segall, and W.F. Haddon, *Formation of cyclic adducts of deoxyguanosine with the aldehydes trans-4-hydroxy-2-hexenal and trans-4-hydroxy-2-nonenal in vitro*. Cancer Res, 1986. **46**(11): p. 5682-6.
222. Fernandes, P.H., et al., *Site-specific mutagenicity of stereochemically defined 1,N2-deoxyguanosine adducts of trans-4-hydroxynonenal in mammalian cells*. Environ Mol Mutagen, 2003. **42**(2): p. 68-74.
223. Sodum, R.S. and F.L. Chung, *Stereoselective formation of in vitro nucleic acid adducts by 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal*. Cancer Res, 1991. **51**(1): p. 137-43.
224. Poli, G., et al., *Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or ADP-iron in isolated rat hepatocytes and rat liver microsomal suspensions*. Biochem J, 1985. **227**(2): p. 629-38.
225. Grune, T., et al., *Identification of metabolic pathways of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by enterocytes of rat small intestine*. Biochem Int, 1991. **25**(5): p. 963-71.
226. Siems, W.G., T. Grune, and H. Esterbauer, *4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine*. Life Sci, 1995. **57**(8): p. 785-9.
227. Grune, T., et al., *Reduced 4-hydroxynonenal degradation in hearts of spontaneously hypertensive rats during normoxia and postischemic reperfusion*. Cell Biochem Funct, 1994. **12**(2): p. 143-7.
228. Grune, T., W.G. Siems, and T. Petras, *Identification of metabolic pathways of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in in situ perfused rat kidney*. Journal of lipid research, 1997. **38**(8): p. 1660-5.

229. Esterbauer, H., H. Zollner, and J. Lang, *Metabolism of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by isolated hepatocytes and by liver cytosolic fractions*. *Biochem J*, 1985. **228**(2): p. 363-73.
230. Siems, W.G., et al., *Metabolic fate of 4-hydroxynonenal in hepatocytes: 1,4-dihydroxynonene is not the main product*. *Journal of lipid research*, 1997. **38**(3): p. 612-22.
231. Boleda, M.D., et al., *Physiological substrates for rat alcohol dehydrogenase classes: aldehydes of lipid peroxidation, omega-hydroxyfatty acids, and retinoids*. *Arch Biochem Biophys*, 1993. **307**(1): p. 85-90.
232. He, Q., et al., *Reduction of 4-hydroxynonenal and 4-hydroxyhexenal by retinal aldose reductase*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **247**(3): p. 719-22.
233. Mitchell, D.Y. and D.R. Petersen, *The oxidation of alpha-beta unsaturated aldehydic products of lipid peroxidation by rat liver aldehyde dehydrogenases*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1987. **87**(3): p. 403-10.
234. Hartley, D.P., J.A. Ruth, and D.R. Petersen, *The hepatocellular metabolism of 4-hydroxynonenal by alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, and glutathione S-transferase*. *Arch Biochem Biophys*, 1995. **316**(1): p. 197-205.
235. Danielson, U.H., H. Esterbauer, and B. Mannervik, *Structure-activity relationships of 4-hydroxyalkenals in the conjugation catalysed by mammalian glutathione transferases*. *Biochem J*, 1987. **247**(3): p. 707-13.
236. Liu, Y., G. Xu, and L.M. Sayre, *Carnosine inhibits (E)-4-hydroxy-2-nonenal-induced protein cross-linking: structural characterization of carnosine-HNE adducts*. *Chemical research in toxicology*, 2003. **16**(12): p. 1589-97.
237. Alary, J., F. Gueraud, and J.P. Cravedi, *Fate of 4-hydroxynonenal in vivo: disposition and metabolic pathways*. *Mol Aspects Med*, 2003. **24**(4-5): p. 177-87.
238. Carbone, D.L., J.A. Doorn, and D.R. Petersen, *4-Hydroxynonenal regulates 26S proteasomal degradation of alcohol dehydrogenase*. *Free Radic Biol Med*, 2004. **37**(9): p. 1430-9.
239. Bardag-Gorce, F., et al., *The effect of ethanol-induced CYP2E1 on proteasome activity: the role of 4-hydroxynonenal*. *Exp Mol Pathol*, 2005. **78**(2): p. 109-15.
240. Alary, J., et al., *Mercapturic acid conjugates as urinary end metabolites of the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal in the rat*. *Chem Res Toxicol*, 1995. **8**(1): p. 34-9.
241. Alary, J., et al., *1,4-Dihydroxynonene mercapturic acid, the major end metabolite of exogenous 4-hydroxy-2-nonenal, is a physiological component of rat and human urine*. *Chem Res Toxicol*, 1998. **11**(2): p. 130-5.
242. Siems, W.G., et al., *Metabolism of 4-hydroxynonenal, a cytotoxic lipid peroxidation product, in thymocytes as an effective secondary antioxidative defense mechanism*. *J Biochem*, 1998. **123**(3): p. 534-9.

243. Zhang, G.F., et al., *Catabolism of 4-hydroxyacids and 4-hydroxynonenal via 4-hydroxy-4-phosphoacyl-CoAs*. The Journal of biological chemistry, 2009. **284**(48): p. 33521-34.
244. Auge, N., et al., *Oxidized LDL-induced smooth muscle cell proliferation involves the EGF receptor/PI-3 kinase/Akt and the sphingolipid signaling pathways*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(12): p. 1990-5.
245. Liu, W., et al., *4-hydroxynonenal triggers an epidermal growth factor receptor-linked signal pathway for growth inhibition*. J Cell Sci, 1999. **112 ( Pt 14)**: p. 2409-17.
246. Shin, Y., et al., *Modulation of D1-like dopamine receptor function by aldehydic products of lipid peroxidation*. Brain Res, 2003. **968**(1): p. 102-13.
247. Li, J., et al., *Regulation of CD95 (Fas) expression and Fas-mediated apoptotic signaling in HLE B-3 cells by 4-hydroxynonenal*. Biochemistry, 2006. **45**(40): p. 12253-64.
248. Re, G., et al., *Plasma lipoperoxidative markers in ischaemic stroke suggest brain embolism*. Eur J Emerg Med, 1997. **4**(1): p. 5-9.
249. Liu, W., et al., *Protein phosphatase 2A-linked and -unlinked caspase-dependent pathways for downregulation of Akt kinase triggered by 4-hydroxynonenal*. Cell Death Differ, 2003. **10**(7): p. 772-81.
250. Rickle, A., et al., *PTEN, Akt, and GSK3beta signalling in rat primary cortical neuronal cultures following tumor necrosis factor-alpha and trans-4-hydroxy-2-nonenal treatments*. J Neurosci Res, 2006. **84**(3): p. 596-605.
251. Dozza, B., et al., *Regulation of glycogen synthase kinase-3beta by products of lipid peroxidation in human neuroblastoma cells*. J Neurochem, 2004. **89**(5): p. 1224-32.
252. Lee, S.J., et al., *4-Hydroxynonenal enhances MMP-2 production in vascular smooth muscle cells via mitochondrial ROS-mediated activation of the Akt/NF-kappaB signaling pathways*. Free radical biology & medicine, 2008. **45**(10): p. 1487-92.
253. Castello, L., et al., *4-Hydroxynonenal signalling to apoptosis in isolated rat hepatocytes: the role of PKC-delta*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1737**(2-3): p. 83-93.
254. Dianzani, M.U., *4-Hydroxynonenal and cell signalling*. Free Radic Res, 1998. **28**(6): p. 553-60.
255. Chiarpotto, E., et al., *Regulation of rat hepatocyte protein kinase C beta isoenzymes by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal: A signaling pathway to modulate vesicular transport of glycoproteins*. Hepatology, 1999. **29**(5): p. 1565-72.
256. Leonarduzzi, G., F. Robbesyn, and G. Poli, *Signaling kinases modulated by 4-hydroxynonenal*. Free radical biology & medicine, 2004. **37**(11): p. 1694-702.
257. Awasthi, Y.C., et al., *Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling*. Mol Aspects Med, 2003. **24**(4-5): p. 219-30.

258. Camandola, S., G. Poli, and M.P. Mattson, *The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal increases AP-1-binding activity through caspase activation in neurons*. J Neurochem, 2000. **74**(1): p. 159-68.
259. Parola, M., G. Robino, and M.U. Dianzani, *4-hydroxy-2,3-alkenals as molecular mediators of oxidative stress in the pathogenesis of liver fibrosis (review)*. Int J Mol Med, 1999. **4**(4): p. 425-32.
260. Paradis, V., et al., *In situ detection of lipid peroxidation by-products in chronic liver diseases*. Hepatology, 1997. **26**(1): p. 135-42.
261. Seki, S., et al., *Pathological significance of oxidative cellular damage in human alcoholic liver disease*. Histopathology, 2003. **42**(4): p. 365-71.
262. Page, S., et al., *4-Hydroxynonenal prevents NF-kappaB activation and tumor necrosis factor expression by inhibiting IkappaB phosphorylation and subsequent proteolysis*. J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 11611-8.
263. Minekura, H., et al., *4-Hydroxy-2-nonenal is a powerful endogenous inhibitor of endothelial response*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **282**(2): p. 557-61.
264. Shi, Q., et al., *Alterations of metabolic activity in human osteoarthritic osteoblasts by lipid peroxidation end product 4-hydroxynonenal*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(6): p. R159.
265. Ruef, J., et al., *4-hydroxynonenal induces apoptosis, NF-kappaB-activation and formation of 8-isoprostane in vascular smooth muscle cells*. Basic Res Cardiol, 2001. **96**(2): p. 143-50.
266. Camandola, S., et al., *Biogenic 4-hydroxy-2-nonenal activates transcription factor AP-1 but not NF-kappa B in cells of the macrophage lineage*. Biofactors, 1997. **6**(2): p. 173-9.
267. Grasse, L.D., M.W. Lame, and H.J. Segall, *In vivo covalent binding of trans-4-hydroxy-2-hexenal to rat liver macromolecules*. Toxicol Lett, 1985. **29**(1): p. 43-9.
268. Bacot, S., et al., *Evidence for in situ ethanolamine phospholipid adducts with hydroxy-alkenals*. Journal of lipid research, 2007. **48**(4): p. 816-25.
269. Brichac, J., et al., *Enantioselective oxidation of trans-4-hydroxy-2-nonenal is aldehyde dehydrogenase isozyme and Mg<sup>2+</sup> dependent*. Chem Res Toxicol, 2007. **20**(6): p. 887-95.
270. Lee, J.Y., et al., *Induction of endothelial apoptosis by 4-hydroxyhexenal*. Eur J Biochem, 2004. **271**(7): p. 1339-47.
271. Choudhary, S., et al., *Toxicity and detoxification of lipid-derived aldehydes in cultured retinal pigmented epithelial cells*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **204**(2): p. 122-34.
272. Lee, J.Y., et al., *Induction of endothelial iNOS by 4-hydroxyhexenal through NF-kappaB activation*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(4): p. 539-48.



273. Horowitz, S., et al., *Changes in gene expression in hyperoxia-induced neonatal lung injury*. Am J Physiol, 1990. **258**(2 Pt 1): p. L107-11.
274. Schock, B.C., et al., *Oxidative stress and increased type-IV collagenase levels in bronchoalveolar lavage fluid from newborn babies*. Pediatr Res, 2001. **50**(1): p. 29-33.
275. Han, R.N., et al., *Changes in structure, mechanics, and insulin-like growth factor-related gene expression in the lungs of newborn rats exposed to air or 60% oxygen*. Pediatr Res, 1996. **39**(6): p. 921-9.
276. Wilborn, A.M., L.B. Evers, and A.T. Canada, *Oxygen toxicity to the developing lung of the mouse: role of reactive oxygen species*. Pediatr Res, 1996. **40**(2): p. 225-32.
277. Saugstad, O.D., *Chronic lung disease: the role of oxidative stress*. Biol Neonate, 1998. **74 Suppl 1**: p. 21-8.
278. Ogihara, T., et al., *Raised concentrations of aldehyde lipid peroxidation products in premature infants with chronic lung disease*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 1999. **80**(1): p. F21-5.
279. Guzy, R.D. and P.T. Schumacker, *Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia*. Exp Physiol, 2006. **91**(5): p. 807-19.
280. Balazy, M. and S. Chemtob, *Trans-arachidonic acids: new mediators of nitro-oxidative stress*. Pharmacol Ther, 2008. **119**(3): p. 275-90.
281. Volpe, J.J., *Neurology of the newborn*. Major Probl Clin Pediatr, 1981. **22**: p. 1-648.
282. Dammann, O. and A. Leviton, *Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn*. Pediatr Res, 1997. **42**(1): p. 1-8.
283. Dugan, L.L. and D.W. Choi, *Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes*. Ann Neurol, 1994. **35 Suppl**: p. S17-21.
284. Lipton, S.A. and P.A. Rosenberg, *Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders*. N Engl J Med, 1994. **330**(9): p. 613-22.
285. Dogan, M., et al., *Evaluation of oxidant and antioxidant status in infants with hyperbilirubinemia and kernicterus*. Hum Exp Toxicol, 2011.
286. Feuer, G. and C.J. Di Fonzo, *Intrahepatic cholestasis: a review of biochemical-pathological mechanisms*. Drug Metabol Drug Interact, 1992. **10**(1-2): p. 1-161.
287. Puder, M., *Infant parenteral nutrition-associated cholestasis: a severe iatrogenic disease*. JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition, 2010. **34**(1): p. 94-5.
288. Trauner, M., P.J. Meier, and J.L. Boyer, *Molecular pathogenesis of cholestasis*. N Engl J Med, 1998. **339**(17): p. 1217-27.
289. Larsen, F.S. and P.N. Bjerring, *Acute liver failure*. Curr Opin Crit Care, 2011. **17**(2): p. 160-4.

290. Devictor, D., et al., *Acute liver failure in children*. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2011.
291. Tanret, I. and D. Duh, [*The Reye syndrome*]. J Pharm Belg, 2011(1): p. 13-5.
292. Ciocca, M. and F. Alvarez, [*Transient neonatal cholestasis*]. Arch Argent Pediatr, 2011. **109**(2): p. 163-166.
293. Gujral, J.S., et al., *Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice*. Hepatology, 2003. **38**(2): p. 355-63.
294. Willis, T.C., et al., *High rates of mortality and morbidity occur in infants with parenteral nutrition-associated cholestasis*. JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition, 2010. **34**(1): p. 32-7.
295. Bruccoleri, A., et al., *Induction of early-immediate genes by tumor necrosis factor alpha contribute to liver repair following chemical-induced hepatotoxicity*. Hepatology, 1997. **25**(1): p. 133-41.
296. Plebani, M., et al., *Cytokines and the progression of liver damage in experimental bile duct ligation*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1999. **26**(4): p. 358-63.
297. Green, R.M., D. Beier, and J.L. Gollan, *Regulation of hepatocyte bile salt transporters by endotoxin and inflammatory cytokines in rodents*. Gastroenterology, 1996. **111**(1): p. 193-8.
298. Green, R.M., et al., *Interleukin-6 inhibits hepatocyte taurocholate uptake and sodium-potassium-adenosinetriphosphatase activity*. Am J Physiol, 1994. **267**(6 Pt 1): p. G1094-100.
299. Utili, R., C.O. Abernathy, and H.J. Zimmerman, *Cholestatic effects of Escherichia coli endotoxin on the isolated perfused rat liver*. Gastroenterology, 1976. **70**(2): p. 248-53.
300. Whiting, J.F., et al., *Tumor necrosis factor-alpha decreases hepatocyte bile salt uptake and mediates endotoxin-induced cholestasis*. Hepatology, 1995. **22**(4 Pt 1): p. 1273-8.
301. Geier, A., et al., *Effects of proinflammatory cytokines on rat organic anion transporters during toxic liver injury and cholestasis*. Hepatology, 2003. **38**(2): p. 345-54.
302. Belli, D.C., et al., *Homocysteine prevents total parenteral nutrition (TPN)-induced cholestasis without changes in hepatic oxidative stress in the rat*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2003. **36**(2): p. 200-5.
303. Jaeschke, H., *Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(6): p. G1083-8.
304. Jaeschke, H. and A. Farhood, *Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver*. Am J Physiol, 1991. **260**(3 Pt 1): p. G355-62.

305. Liu, P., et al., *Activation of Kupffer cells and neutrophils for reactive oxygen formation is responsible for endotoxin-enhanced liver injury after hepatic ischemia*. Shock, 1995. **3**(1): p. 56-62.
306. Shiratori, Y., et al., *Modulation of hepatotoxicity by macrophages in the liver*. Hepatology, 1988. **8**(4): p. 815-21.
307. Jaeschke, H., *Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts*. J Gastroenterol Hepatol, 2011. **26 Suppl 1**: p. 173-9.
308. Jaeschke, H., et al., *Glutathione peroxidase-deficient mice are more susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidant stress*. Hepatology, 1999. **29**(2): p. 443-50.
309. Gujral, J.S., et al., *NADPH oxidase-derived oxidant stress is critical for neutrophil cytotoxicity during endotoxemia*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **287**(1): p. G243-52.
310. Hasegawa, T., et al., *Generation of hypochlorite-modified proteins by neutrophils during ischemia-reperfusion injury in rat liver: attenuation by ischemic preconditioning*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **289**(4): p. G760-7.
311. Gujral, J.S., et al., *Functional importance of ICAM-1 in the mechanism of neutrophil-induced liver injury in bile duct-ligated mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **286**(3): p. G499-507.
312. Nieminen, A.L., et al., *Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species*. Am J Physiol, 1997. **272**(4 Pt 1): p. C1286-94.
313. Uchiyama, A., et al., *Translocation of iron from lysosomes into mitochondria is a key event during oxidative stress-induced hepatocellular injury*. Hepatology, 2008. **48**(5): p. 1644-54.
314. Knight, T.R., et al., *Role of lipid peroxidation as a mechanism of liver injury after acetaminophen overdose in mice*. Toxicol Sci, 2003. **76**(1): p. 229-36.
315. Wendel, A. and S. Feuerstein, *Drug-induced lipid peroxidation in mice--I. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status*. Biochem Pharmacol, 1981. **30**(18): p. 2513-20.
316. Mathews, W.R., et al., *Lipid peroxidation as molecular mechanism of liver cell injury during reperfusion after ischemia*. Free Radic Biol Med, 1994. **16**(6): p. 763-70.
317. Tasker, S., A.J. Mackin, and M.J. Day, *Primary immune-mediated thrombocytopenia in a cat*. The Journal of small animal practice, 1999. **40**(3): p. 127-31.
318. Lippert, A.C., et al., *Total parenteral nutrition in clinically normal cats*. Journal of the American Veterinary Medical Association, 1989. **194**(5): p. 669-76.

319. Chen, S.S., et al., *Impact of enteral and parenteral nutrition on hepatic and muscle glucose metabolism*. JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition, 2000. **24**(5): p. 255-60.
320. Lewittes, M., et al., *Resistance of the suckling guinea pig to lithocholic acid-induced cholestasis*. Hepatology, 1984. **4**(3): p. 486-91.
321. Bhatia, J. and D.K. Rassin, *Photosensitized oxidation of tryptophan and hepatic dysfunction in neonatal gerbils*. JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition, 1985. **9**(4): p. 491-5.
322. Pitkanen, O.M., *Peroxidation of lipid emulsions: a hazard for the premature infant receiving parenteral nutrition?* Free Radic Biol Med, 1992. **13**(3): p. 239-45.
323. Pitkanen, O.M., *Parenteral lipids and the preterm infant: between Scylla and Charybdis*. Acta Paediatr, 2004. **93**(8): p. 1028-30.
324. Picaud, J.C., et al., *Lipid peroxidation assessment by malondialdehyde measurement in parenteral nutrition solutions for newborn infants: a pilot study*. Acta Paediatr, 2004. **93**(2): p. 241-5.
325. Laborie, S., et al., *Contribution of multivitamins, air, and light in the generation of peroxides in adult and neonatal parenteral nutrition solutions*. Ann Pharmacother, 2000. **34**(4): p. 440-5.
326. Zarkovic, N., *4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes*. Mol Aspects Med, 2003. **24**(4-5): p. 281-91.
327. Chessex, P., et al., *Determinants of oxidant stress in extremely low birth weight premature infants*. Free Radic Biol Med, 2010. **49**(9): p. 1380-6.
328. Volkel, W., et al., *Glutathione conjugates of 4-hydroxy-2(E)-nonenal as biomarkers of hepatic oxidative stress-induced lipid peroxidation in rats*. Free Radic Biol Med, 2005. **38**(11): p. 1526-36.
329. Papadakis, K.A. and S.R. Targan, *Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors*. Gastroenterology, 2000. **119**(4): p. 1148-57.
330. Armbrust, T., E. Schmitt, and G. Ramadori, *Viable rat Kupffer cells synthesize but do not secrete interleukin-1: indications for necrosis-induced maturation of interleukin-1 alpha, but not of interleukin-1 beta*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **207**(2): p. 637-45.
331. Thornton, A.J., J. Ham, and S.L. Kunkel, *Kupffer cell-derived cytokines induce the synthesis of a leukocyte chemotactic peptide, interleukin-8, in human hepatoma and primary hepatocyte cultures*. Hepatology, 1991. **14**(6): p. 1112-22.
332. Liu, Y., et al., *Triglyceride with medium-chain fatty acids increases the activity and expression of hormone-sensitive lipase in white adipose tissue of C57BL/6J mice*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2011. **75**(10): p. 1939-44.
333. Carpentier, Y.A., et al., *Preclinical investigations of a medium-chain triglyceride: fish oil emulsion. I. Effects of bovine milk lipoprotein lipase on lipid composition*. International journal of molecular medicine, 2006. **18**(4): p. 761-73.

334. Tomsits, E., et al., *Safety and efficacy of a lipid emulsion containing a mixture of soybean oil, medium-chain triglycerides, olive oil, and fish oil: a randomised, double-blind clinical trial in premature infants requiring parenteral nutrition*. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition, 2010. **51**(4): p. 514-21.
335. Webb, A.N., et al., *Tolerability and safety of olive oil-based lipid emulsion in critically ill neonates: a blinded randomized trial*. Nutrition, 2008. **24**(11-12): p. 1057-64.
336. Sun, Y.P., et al., *Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer. Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation*. J Biol Chem, 2007. **282**(13): p. 9323-34.
337. Michalski, M.C., et al., *Oxidation products of polyunsaturated fatty acids in infant formulas compared to human milk--a preliminary study*. Mol Nutr Food Res, 2008. **52**(12): p. 1478-85.
338. Kesavulu, M.M., et al., *Effect of omega-3 fatty acids on lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in type 2 diabetic patients*. Diabetes Metab, 2002. **28**(1): p. 20-6.
339. Benson, M.K. and K. Devi, *Influence of omega-6/omega-3 rich dietary oils on lipid profile and antioxidant enzymes in normal and stressed rats*. Indian J Exp Biol, 2009. **47**(2): p. 98-103.
340. Turcot, V., et al., *Long-term impact of an antioxidant-deficient neonatal diet on lipid and glucose metabolism*. Free Radic Biol Med, 2009. **47**(3): p. 275-82.
341. Korzhov, V.I. and V.N. Zhadan, *[Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on activity of glutathione-dependent enzymes in the liver cytosol and blood erythrocytes in rats with experimental chronic bronchitis and in the norm]*. Ukr Biokhim Zh, 2003. **75**(4): p. 115-9.
342. Hao, W., et al., *omega-3 fatty acids suppress inflammatory cytokine production by macrophages and hepatocytes*. Journal of pediatric surgery, 2010. **45**(12): p. 2412-8.
343. Musiek, E.S., et al., *Electrophilic cyclopentenone neuroprostanes are anti-inflammatory mediators formed from the peroxidation of the omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid*. J Biol Chem, 2008. **283**(29): p. 19927-35.
344. Calder, P.C., *n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(6 Suppl): p. 1505S-1519S.
345. Mori, T.A. and L.J. Beilin, *Omega-3 fatty acids and inflammation*. Curr Atheroscler Rep, 2004. **6**(6): p. 461-7.
346. Belluzzi, A., et al., *Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease*. N Engl J Med, 1996. **334**(24): p. 1557-60.

347. De Caterina, R., et al., *The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells*. *Arterioscler Thromb*, 1994. **14**(11): p. 1829-36.
348. Komatsu, W., et al., *Docosahexaenoic acid suppresses nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in interferon-gamma plus lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages by inhibiting the oxidative stress*. *Free Radic Biol Med*, 2003. **34**(8): p. 1006-16.
349. Volker, D., et al., *Efficacy of fish oil concentrate in the treatment of rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol*, 2000. **27**(10): p. 2343-6.
350. Weldon, S.M., et al., *Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid*. *J Nutr Biochem*, 2007. **18**(4): p. 250-8.
351. Marcheselli, V.L., et al., *Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(44): p. 43807-17.
352. Schmidt-Sommerfeld, E., D. Penn, and H. Wolf, *Carnitine deficiency in premature infants receiving total parenteral nutrition: effect of L-carnitine supplementation*. *J Pediatr*, 1983. **102**(6): p. 931-5.
353. Larsson, L.E., et al., *Parenteral nutrition in preterm neonates with and without carnitine supplementation*. *Acta Anaesthesiol Scand*, 1990. **34**(6): p. 501-5.
354. Zlotkin, S.H. and G.H. Anderson, *The development of cystathionase activity during the first year of life*. *Pediatr Res*, 1982. **16**(1): p. 65-8.
355. Moss, R.L., et al., *Methionine infusion reproduces liver injury of parenteral nutrition cholestasis*. *Pediatr Res*, 1999. **45**(5 Pt 1): p. 664-8.
356. Shoveller, A.K., et al., *N-acetylcysteine is a highly available precursor for cysteine in the neonatal piglet receiving parenteral nutrition*. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*, 2006. **30**(2): p. 133-42.
357. Borgstrom, L., B. Kagedal, and O. Paulsen, *Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man*. *Eur J Clin Pharmacol*, 1986. **31**(2): p. 217-22.
358. Olsson, B., et al., *Pharmacokinetics and bioavailability of reduced and oxidized N-acetylcysteine*. *Eur J Clin Pharmacol*, 1988. **34**(1): p. 77-82.
359. Van Goudoever, J.B., et al., *Amino acid solutions for premature neonates during the first week of life: the role of N-acetyl-L-cysteine and N-acetyl-L-tyrosine*. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*, 1994. **18**(5): p. 404-8.
360. Friel, J.K., et al., *Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infant formula*. *Pediatr Res*, 2002. **51**(5): p. 612-8.
361. Ledo, A., et al., *Human milk enhances antioxidant defenses against hydroxyl radical aggression in preterm infants*. *Am J Clin Nutr*, 2009. **89**(1): p. 210-5.

362. Briante, R., F. Febbraio, and R. Nucci, *Antioxidant properties of low molecular weight phenols present in the mediterranean diet*. Journal of agricultural and food chemistry, 2003. **51**(24): p. 6975-81.
363. Roche, M., et al., *Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry*. Org Biomol Chem, 2005. **3**(3): p. 423-30.
364. Bitzer-Quintero, O.K., et al., *Antioxidant activity of tryptophan in rats under experimental endotoxic shock*. Biomed Pharmacother, 2010. **64**(1): p. 77-81.
365. Tsopmo, A., et al., *Tryptophan released from mother's milk has antioxidant properties*. Pediatr Res, 2009. **66**(6): p. 614-8.
366. Watanabe, S., et al., *L-tryptophan as an antioxidant in human placenta extract*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2002. **48**(1): p. 36-9.
367. Christen, S., E. Peterhans, and R. Stocker, *Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: possible implication for inflammatory diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(7): p. 2506-10.
368. Minekawa, R., et al., *Human breast milk suppresses the transcriptional regulation of IL-1beta-induced NF-kappaB signaling in human intestinal cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **287**(5): p. C1404-11.
369. An, M.J., et al., *Bovine colostrum inhibits nuclear factor kappaB-mediated proinflammatory cytokine expression in intestinal epithelial cells*. Nutr Res, 2009. **29**(4): p. 275-80.
370. Soghier, L.M. and L.P. Brion, *Cysteine, cystine or N-acetylcysteine supplementation in parenterally fed neonates*. Cochrane Database Syst Rev, 2006(4): p. CD004869.
371. Mirtallo, J.M., *Complications associated with drug and nutrient interactions*. J Infus Nurs, 2004. **27**(1): p. 19-24.
372. Luo, C., et al., *The role of COX-2 and Nrf2/ARE in anti-inflammation and antioxidative stress: Aging and anti-aging*. Med Hypotheses, 2011.
373. Gao, L., et al., *Novel n-3 fatty acid oxidation products activate Nrf2 by destabilizing the association between Keap1 and Cullin3*. J Biol Chem, 2007. **282**(4): p. 2529-37.