

2m11.3222.4

Université de Montréal

**Évaluation d'un modèle *in vitro* dans l'étude des effets d'un apport  
supplémentaire de cystéine chez le nouveau-né humain**

par

Roxanne Gendron

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de M. Sc.

en Sciences biomédicales

Février, 2003

©Roxanne Gendron, 2003





**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

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

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

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

**NOTICE**

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Évaluation d'un modèle *in vitro* dans l'étude des effets d'un apport supplémentaire  
de cystéine chez le nouveau-né humain

présenté par :  
Roxanne Gendron

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Gilles Bleau  
président-rapporteur

Philippe Chessex  
directeur de recherche

Michèle Brochu  
membre du jury

Le changement d'environnement lors de la naissance impose un stress oxydant chez le nouveau-né, et de ce fait, la maturité fœtale est d'une importance capitale. Un stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre la charge oxydante et la capacité des systèmes antioxydants à maintenir cette charge à un niveau acceptable. Le système glutathion joue un rôle central dans ce mécanisme.

Considérant que des concentrations faibles en glutathion sont associées à un stress oxydant et à certaines maladies chez les nouveau-nés, le rôle d'un apport supplémentaire de cystéine, substrat limitatif de la synthèse du glutathion, a été évalué dans des cellules de la veine du cordon ombilical (HUVEC). Les cellules provenant de filles ou de garçons ont été étudiées afin de comparer la vitesse de prolifération cellulaire *in vitro* selon le genre, un indice possible du degré de maturité des cellules *in vivo*.

Nous avons observé une vitesse de prolifération cellulaire plus grande pour les cultures provenant de garçons que pour celles de filles. Le taux de division cellulaire étant plus élevé, la synthèse protéique nécessaire à cette croissance pourrait être favorisée au détriment de la synthèse de glutathion. Cependant, l'apport supplémentaire de cystéine n'a pas causé d'augmentation statistiquement significative de la concentration en glutathion, tant dans les cellules des garçons que celles des filles. La différence proliférative des HUVEC suggère une différence dans la maturation fœtale selon le genre. Ce phénomène serait compatible avec une maturité de la défense antioxydante plus grande chez les filles que chez les garçons.

Mots clés : Défense antioxydante, glutathion, HUVEC, maturité fœtale, prolifération cellulaire, stress oxydant

During the birth process, the foetus needs to be mature enough in order to prevent any complications due to the passage into a relatively hyperoxic environment. Oxidative stress is defined as an imbalance between oxidant load and the capacity of the cell to maintain this load compatible with normal cell functions. Glutathione is central to the antioxidant defense system as it helps to maintain this balance.

As low levels of intracellular glutathione are often associated with oxidative stress and with some pathologies in the newborn, the effect of cysteine, the limiting substrate in glutathione synthesis, has been evaluated in an *in vitro* model using human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Cells from male or female newborns were used to determine the cellular proliferation rate according to gender, which may be a possible indication of the degree of *in vivo* cell maturity.

We observed a more rapid cellular proliferation in cells isolated from male, compared to female. As cellular division is more important, protein synthesis needed for cell growth may predominate over glutathione synthesis. However, supplemental cysteine did not show a statistically significant increase in the intracellular concentration of glutathione. The proliferating difference suggests a difference in foetal maturity between male and female. This phenomena may be compatible with the greater maturity of the antioxidant defence in girls as compared with boys.

Key words : Antioxidant defense, cellular proliferation, foetal maturity, glutathione, HUVEC, oxidative stress

## TABLE DES MATIÈRES

Identification du jury .....	ii
Résumé français .....	iii
Résumé anglais .....	iv
Table des matières .....	v
Liste des tableaux .....	vii
Liste des figures .....	viii
Liste des abréviations .....	ix
Remerciements .....	xii
1. INTRODUCTION .....	1
1.1 Pathologies liées à un stress oxydant chez le nouveau-né .....	2
1.2 Sources de radicaux libres .....	4
1.3 La défense antioxydante .....	5
1.4 La maturité fœtale et la défense antioxydante .....	7
1.5 Le développement de la défense antioxydante en période périnatale .....	11
1.5.1 La naissance par voie vaginale .....	11
1.5.2 La période néonatale .....	12
1.5.3 Les antioxydants du lait maternel .....	14
1.6 Le rôle du glutathion .....	16
1.7 Hypothèse de travail .....	22

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	25
2.1 Culture cellulaire .....	26
2.2 Analyse de la prolifération .....	27
2.3 Détermination du glutathion intracellulaire .....	29
2.4 Incorporation de cystéine .....	31
2.5 Analyse statistique .....	33
3. RÉSULTATS .....	34
3.1 Prolifération cellulaire .....	35
3.2 Concentration intracellulaire en glutathion total et effet de la cystéine .....	43
3.3 Incorporation de cystéine .....	45
4. DISCUSSION .....	49
BIBLIOGRAPHIE .....	61



**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I. Défense antioxydante : réactions non enzymatiques .....	6
Tableau II. Défense antioxydante : réactions enzymatiques .....	7
Tableau III. Indices de prolifération cellulaire des HUVEC .....	43
Tableau IV. Vitesse d'incorporation de cystéine selon les fractions cellulaires .....	46
Tableau V. Quantité de protéines selon les traitements .....	47

**LISTE DES FIGURES**

Figure 1. Cycle d'oxydoréduction du glutathion .....	18
Figure 2. Prolifération cellulaire pour les HUVEC provenant de filles .....	37
Figure 3. Prolifération cellulaire pour les HUVEC provenant de garçons .....	37
Figure 4. Ajustement d'une fonction logistique sur les courbes de prolifération .....	38
Figure 5. Courbe d'incorporation de thymidine pour les HUVEC de filles .....	40
Figure 6. Courbe d'incorporation de thymidine pour les HUVEC de garçons .....	41
Figure 7. Concentration intracellulaire en glutathion en présence de cystéine .....	44

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

A : acide déhydroascorbique

A<sup>•</sup> : radical acide déhydroascorbique

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

AH<sup>-</sup> ou AH<sub>2</sub> : acide ascorbique, vitamine C

ANOVA : ANalysis Of VAriance, analyse de variance

ASS : acide sulfosalicylique

ATP : adénosine triphosphate

BSA : Bovine Serum Albumine, albumine de sérum bovin

BSO : DL-buthionine-[S,R]-sulfoximine

CAT : catalase

CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone

CPM : compte par minute

L-Cys ou CYS : cystéine

DBP : dysplasie bronchopulmonaire

DPM : désintégration par minute

DTNB : acide dithiobis-2-nitrobenzoïque

ECGF : Endothelial Cell Growth Factor, facteur de croissance pour cellules  
endothéliales

FBS : Fetal Bovine Serum, sérum de veau fœtal

GGT :  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase

L-Glu : acide glutamique

L-  $\gamma$ -Glu-Cys :  $\gamma$ -glutamylcystéine

Gly : glycine

GPX : glutathion peroxydase

GSH : glutathion réduit

GSSG : glutathion oxydé

H<sup>+</sup> : ion hydrogène

HO<sup>•</sup> : radical hydroxyle

H<sub>2</sub>O : molécule d'eau

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène

HCl : acide chlorhydrique

HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells, cellules de la veine du cordon  
ombilical

LOO<sup>•</sup> : radical hydroperoxyde lipidique

LOOH : hydroperoxyde lipidique

NAC : N-acétylcystéine

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NADP<sup>+</sup> : NADPH oxydé

NaOH : hydroxyde de sodium

NH<sub>4</sub>OH : hydroxyde d'ammonium

O<sub>2</sub> : molécule d'oxygène

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> : radical superoxyde

OTC : L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate

Pi : phosphate inorganique

PBS : Phosphate Buffer Saline, tampon phosphate salin

PGI<sub>2</sub> : prostaglandine

R• : radical alkyle

RH : alkyle

ROH : alkyle hydroxyde

ROO• : radical hydroperoxyde

ROOH : hydroperoxyde

SDR : syndrome de détresse respiratoire

SOD : superoxyde dismutase

TNB : acide thiobenzoïque

$\alpha$ -TO• : radical alkoxy  $\alpha$ -tocophérol

$\alpha$ -TOH :  $\alpha$ -tocophérol, vitamine E

## REMERCIEMENTS

La volonté d'accomplir et de terminer ce travail de maîtrise a d'abord été alimentée par Antoine, Joséphine et Béatrice et leur enthousiasme à voir leur mère étudier et aller à l'école tout comme eux. Je les remercie d'avoir accepté docilement les gardiennes, Marie-Michèle, Mélanie et Jamila, qui m'ont grandement aidé tout au long de ces études. Je tiens aussi à remercier mes amis Sophie, Pierre, Jocelyne, Claude, Thérèse et Aida, pour leurs encouragements et leur soutien moral. Un gros merci à mon présent patron, Baruch Toledano, qui m'a offert un environnement favorable à la rédaction de ce mémoire et qui a accepté d'en faire lecture.

La collaboration du personnel de la salle d'accouchement de l'hôpital Sainte-Justine a été essentielle à la réalisation de ce projet et je les remercie de leur appui. Je me dois de souligner l'accueil de mon directeur, Philippe Chessex, au sein de son équipe de recherche pour l'accomplissement de ce travail.

Je m'en voudrais de passer sous silence le temps accordé par Jane-Aimée Montgomery, initialement présidente-rapporteuse du jury. Je la remercie infiniment pour son implication et son dévouement à parachever ce manuscrit.

## 1. INTRODUCTION

Au moment de la naissance, le fœtus humain passe d'un environnement à très faible concentration en oxygène à un environnement relativement hyperoxique. Ce changement entraîne donc *de facto* une source potentielle de stress oxydant au nouveau-né. Ceci implique que le fœtus doit atteindre une certaine maturité afin qu'il puisse survivre hors de la matrice utérine; les organes fœtaux doivent avoir développé les systèmes cellulaires nécessaires pour contrer les effets oxydants de l'environnement extérieur et permettre au nouveau-né d'optimiser son potentiel de croissance sans compromettre son état de santé général.

Chez la majorité des nouveau-nés à terme et en santé, le mécanisme de la naissance semble être un élément de maturation et déclencher la mise en fonction de certains systèmes de défense tels que la sécrétion de surfactant pulmonaire et la capacité antioxydante plasmatique (Jain, 1999; Metsvaht, 1999). Cependant, une proportion de la population de nouveau-nés, plus particulièrement les prématurés, éprouvent des difficultés à surmonter ce stress (Narayan, 1994).

### 1.1 Pathologies liées à un stress oxydant chez le nouveau-né

Un stress oxydant est généralement défini comme un déséquilibre entre la charge oxydante produite, entre autres par les radicaux libres, et la capacité des systèmes antioxydants intracellulaires et extracellulaires à maintenir cette charge à un niveau acceptable pour l'organisme (Saugstad, 1998). Les stress oxydants pouvant affecter



les nouveau-nés sont de diverses origines : ceux reliés à la naissance telles l'asphyxie ou l'ischémie, ceux découlant de thérapies telles l'oxygénation ou une ventilation mécanique ou encore, ceux associés à l'alimentation telles les solutions parentérales lipidiques, d'acides aminés ou de multivitamines et les préparations lactées pour nourrissons à terme ou prématurés (Schwarz, 1997; Thibeault, 2000; van Zoeren-Grobbe, 1994). Le système hypoxanthine-xanthine oxydase ainsi que les phagocytes activés à la suite d'une infection postnatale libèrent aussi des radicaux libres provoquant un stress oxydant (Bracci, 1997). Les prématurés sont plus particulièrement touchés puisque la quantité d'oxygène reçue est relativement plus élevée compte tenu de leur immaturité pulmonaire et d'une insuffisance de surfactant, de leur défense antioxydante réduite et possiblement de leur faible capacité à induire la synthèse d'enzymes antioxydantes lors d'une situation de stress (Saugstad, 1998).

Quoique non clairement établie, l'étiologie de certaines complications les plus couramment rencontrées chez les nouveau-nés met en évidence certains facteurs de stress menant directement ou indirectement à un surplus de radicaux libres dans l'organisme (Saugstad, 1990). La dysplasie bronchopulmonaire (DBP) est souvent la conséquence d'une thérapie d'oxygénation, cette dernière augmentant la charge oxydante, et le syndrome de détresse respiratoire (SDR) demeure un facteur de risque important pour le développement de la DBP (Cole, 2000). D'autres pathologies, non directement associés au système respiratoire, semblent aussi avoir une pathogénèse reliée au stress oxydant. Tel est le cas de la rétinopathie de prématurité, de l'entérocolite nécrosante du nouveau-né et de l'hémorragie intracrânienne qui sont

régulièrement associées à des concentrations élevées en radicaux libres (Goddart-Finegold, 1998; Neu, 1999; Saugstad, 1990;).

## 1.2 Sources de radicaux libres

Chez l'être humain, l'oxygène inspiré et métabolisé est réduit d'environ 98 % par la cytochrome c oxydase présente dans les mitochondries. La structure de cette enzyme comprend quatre centres d'oxydoréduction (redox) qui fournissent à la fois quatre électrons à une molécule d'oxygène pour produire deux molécules d'eau. Ce système de réduction permet donc d'éviter la formation d'espèces oxygène actives. D'autres enzymes intermédiaires de systèmes redox, mais qui n'ont pas la structure spécifique de la cytochrome c oxydase, peuvent aussi fournir des électrons à l'oxygène. Ces électrons sont dits libres, parce que les enzymes ne peuvent fournir quatre électrons à la fois comme la cytochrome c oxydase, et risquent d'entraîner des réactions en chaîne amenant à la formation de radicaux libres.

La cellule aérobie a cependant développé une défense contre ces électrons potentiellement réactifs en les transférant au  $\text{NADP}^+$  pour produire du NADPH, ce dernier résistant aux réactions avec l'oxygène de par sa stabilité cinétique. Cette défense n'est toutefois pas imperméable, laissant échapper des électrons par le Complexe I et l'ubisémiquinone, molécules nécessaires à la respiration de la mitochondrie et qui constituent la principale source de production de superoxyde

intracellulaire (McCord, 2000). Paradoxalement, cette perte d'électrons qui peuvent réagir avec l'oxygène est essentielle à l'homéostasie de l'organisme. Par exemple, la formation de superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) pouvant mener au peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ont tous deux un effet cytotoxique pour lutter contre les pathogènes. De plus, le peroxyde d'hydrogène, plus réactif que le superoxyde, est à l'origine du radical hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ) qui entraîne des réactions en chaîne de radicaux libres nécessaires au maintien de l'intégrité cellulaire. Ce radical hydroxyle est impliqué, entre autres, dans l'oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN (Miller, 1997). L'organisme doit donc, par des mécanismes intra- et extracellulaires, contrebalancer l'effet cytotoxique des espèces oxygène produites et maintenir un équilibre en réponse à l'oxydation par ces mêmes espèces oxygène.

### 1.3 La défense antioxydante

Ainsi, l'adaptation de la cellule aérobie à un environnement riche en oxygène comprend une fonction protectrice en considération de son métabolisme respiratoire et de la défense de l'organisme contre les pathogènes. Pour maintenir la concentration en radicaux libres à un niveau qui évite de causer des dommages cellulaires, l'élimination des surplus d'oxydants peut se faire par des molécules réductrices de faible poids moléculaire telles l' $\alpha$ -tocophérol, l'acide ascorbique, le  $\beta$ -carotène et le glutathion ou par des systèmes plus complexes de réactions enzymatiques notamment la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase (Freeman, 1982).

L'acide ascorbique (vitamine C, hydrosoluble) et l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E, liposoluble) sont relativement efficaces pour réduire les radicaux libres sous une forme moins toxique (Stadtman, 1991; Thomas, 1995).

Cependant, la défense antioxydante est principalement dominée par les réactions catalytiques dont l'action est plus spécifique quant au type d'oxydants ciblés par les enzymes. La superoxyde dismutase (SOD) élimine l'anion superoxyde autant dans le cytosol et la mitochondrie que dans le milieu extracellulaire. Quant au peroxyde d'hydrogène et aux peroxydes organiques, ils sont éliminés par la glutathion peroxydase (GPX) et la catalase (Matés, 1999; McCord, 2000). Les principales réactions de la défense antioxydante sont résumées aux tableaux I et II qui suivent.

Tableau I. Défense antioxydante : réactions non enzymatiques

Vitamine C	$AH^{\cdot} + HO^{\cdot} \longrightarrow H_2O + A^{\cdot}$
	$AH^{\cdot} + O_2^{\cdot-} + H^+ \longrightarrow H_2O_2 + A^{\cdot}$
	$AH^{\cdot} + R^{\cdot} \longrightarrow RH + A^{\cdot}$
	$AH^{\cdot} + \alpha\text{-TO}^{\cdot} \longrightarrow \alpha\text{-TOH} + A^{\cdot}$
	$AH^{\cdot} + H_2O_2 + H^+ \longrightarrow 2H_2O + A$
Vitamine E	$\alpha\text{-TOH} + LOO^{\cdot} \longrightarrow LOOH + \alpha\text{-TO}^{\cdot}$
	$\alpha\text{-TOH} + ROO^{\cdot} \longrightarrow ROOH + \alpha\text{-TO}^{\cdot}$
	$\alpha\text{-TO}^{\cdot} + ROO^{\cdot} \longrightarrow \text{produit non radicalaire}$

Tableau II. Défense antioxydante : réactions enzymatiques

Superoxyde dismutase	$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$
Catalase	$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O_2$
	$ROOH + AH_2 \xrightarrow{CAT} H_2O + ROH + A$
Glutathion peroxydase	$ROOH + 2GSH \xrightarrow{GPX} ROH + GSSG + H_2O$

#### 1.4 La maturité fœtale et la défense antioxydante

La maturation intra-utérine permet, entre autres, aux poumons d'avoir une capacité fonctionnelle optimale après une grossesse menée à terme et sans complications. Le système respiratoire est en effet le premier à être sollicité par le changement d'environnement. À maturité, l'ensemble des fluides extracellulaires couvrant la surface épithéliale des poumons contiennent des systèmes de défense qui permettent à l'organisme d'assurer sa nouvelle fonction respiratoire dès la naissance. En ce qui concerne la défense antioxydante, les fluides pulmonaires contiennent différentes enzymes et protéines qui constituent une première barrière de défense. Les cellules épithéliales du système respiratoire synthétisent et sécrètent la superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase ainsi que certaines protéines qui minimisent les quantités d'ions métalliques libres impliqués dans les réactions d'oxydation. Des études faites chez plusieurs espèces démontrent que la maturation des systèmes enzymatiques antioxydants dans les fluides épithéliaux est semblable, dans le temps, à la production et la sécrétion de surfactant qui prennent place en fin de gestation, soit l'équivalent des quatre à huit dernières semaines chez l'humain (Frank, 1984). On retrouve aussi

dans les fluides épithéliaux extracellulaires des quantités non négligeables de glutathion, d'acide ascorbique et d' $\alpha$ -tocophérol (van der Vliet, 2000).

Un système respiratoire immature comporte des risques pour l'enfant à naître. Au milieu du XX<sup>e</sup> siècle, l'incidence du syndrome de détresse respiratoire chez les nouveau-nés approchait un taux de mortalité de 30 %. Pour la médecine obstétricale, cet état de fait a mis de l'avant le développement de tests servant à prédire la maturité fœtale par le biais du développement pulmonaire. On retrouve, en fait, dans le liquide amniotique une partie des fluides pulmonaires sécrétés par les mouvements respiratoires intra-utérins du fœtus. Différents tests ont donc été élaborés sur la base d'indices déterminés à partir d'échantillons de liquide amniotique par des techniques biochimiques, biophysiques ou encore par l'évaluation visuelle ou optique du liquide (Field, 1997; Liu, 2000). Le ratio lécithine/sphingomyéline est le plus largement utilisé et mesure la quantité de phospholipides produite par les poumons dont la lécithine en est la principale composante (Gluck, 1971). Une méthode moins invasive que les précédentes et qui élimine les risques associés à l'amniocentèse consiste à déterminer la maturité fœtale par résonance magnétique sur les molécules associées au surfactant dans le liquide amniotique (Fenton, 2000).

Outre l'importance de la fonction respiratoire, le fœtus doit atteindre une maturité relative tout aussi capitale au niveau des autres organes. Tout comme les poumons, le système digestif est une interface majeure entre l'organisme et l'environnement extérieur et doit pouvoir supporter l'ingestion et la digestion du lait maternel dès la

naissance ainsi que protéger le nouveau-né des éléments externes. Son développement est intimement lié aux mouvements de déglutition du fœtus dans la matrice utérine. En effet, le liquide amniotique fournit des protéines, des acides aminés et autres molécules nécessaires à la croissance cellulaire du tractus gastro-intestinal (Ross, 1998). Chez le nouveau-né à terme, la muqueuse intestinale constitue une barrière de défense contre les organismes pathogènes en même temps qu'une perméabilité relative pour l'absorption des nutriments, acides aminés et molécules telles que les protéines immunoprotectives. D'autre part, la sécrétion d'acide gastrique est la première ligne de défense contre les antigènes et pathogènes ingérés par le nourrisson et l'estomac doit pouvoir maintenir un pH suffisamment faible (moins de 4) afin de conserver cette fonction protectrice (Israel, 1994).

Un développement incomplet du tractus gastro-intestinal au moment de la naissance peut entraîner certaines pathologies dont la plus fréquente est l'entéocolite nécrosante du nouveau-né, celle-ci se définissant par une nécrose du tissu intestinal couplée à une inflammation (Shah, 2000). L'étiologie de cette pathologie n'est pas clairement établie mais des facteurs de risque associés à sa pathogénèse ont été identifiés. La prématurité est le principal facteur prédisposant les nouveau-nés à cette entéocolite; un système digestif immature se démarque par une fonction immunologique affaiblie, une perméabilité plus grande au niveau de la barrière épithéliale de l'intestin grêle ainsi qu'une digestion et une motilité intestinale réduites.

De plus, chez les prématurés, une alimentation entérale précipitée à base de formule plutôt que de lait maternel et en progression trop rapide semble contribuer de façon significative au développement de l'entérocolite tout comme une infection bactérienne primaire peut aussi être à son origine. Le rôle de l'hypoxie et de l'ischémie comme facteurs de risque est plutôt contradictoire et ces dernières seraient plutôt le résultat d'infections bactériennes ou d'irritation chimique qui induisent une cascade inflammatoire menant à une vasoconstriction secondaire (Neu, 1999). Cependant, une étude de Zhang (1998) démontre que l'hypoxie peut être à l'origine de la production de superoxyde par l'action de la xanthine oxydase ou de la xanthine déshydrogénase via l'oxydation de NADH.

En somme, une défense antioxydante déficiente combinée à l'immaturation du système digestif peut augmenter les risques de développer une entérocolite nécrosante chez les nouveau-nés. Par exemple, lors d'une infection, les endotoxines bactériennes accroissent la production de radicaux libres dans les intestins et l'inflammation est d'autant plus accentuée si la capacité antioxydante est immature (Shah, 2000).

Sans minimiser l'importance des systèmes respiratoire et digestif, il est essentiel de considérer le développement fœtal comme un tout pour l'organisme et que la maturité de ce dernier est déterminée par l'ensemble de ses systèmes vitaux. À titre d'exemple et toujours concernant la défense antioxydante, des études portant sur le sang de nouveau-nés prématurés et à terme ont démontré que certains antioxydants augmentent en concentration en fin de grossesse. L'étude de Ripalda (1989), portant



sur des échantillons de sang de cordon de nouveau-nés dont le poids variait de 520 g à 4210 g, indique une augmentation de l'activité antioxydante des érythrocytes correspondant à des gestations entre 31 et 34 semaines. Aussi, il a été démontré que l'activité antioxydante de protéines plasmatiques augmente en fonction du poids de naissance et de l'âge de gestation (Sullivan, 1988).

## 1.5 Le développement de la défense antioxydante en période périnatale

### 1.5.1 La naissance par voie vaginale

Il semblerait que les contractions utérines et le passage du fœtus dans le canal vaginal aient un rôle à jouer dans l'adaptation du nouveau-né à l'environnement extérieur. Pour que l'échange gazeux qu'exercent les poumons soit efficace à la naissance, l'excès de liquide sécrété par les cellules épithéliales en cours de grossesse doit être éliminé des espaces alvéolaires et le flux sanguin pulmonaire doit être augmenté (Jain, 1999). Il a d'abord été avancé qu'une compression mécanique de la cage thoracique du fœtus lors du passage dans le canal permettait d'expulser le liquide pulmonaire des espaces alvéolaires vers les bronches et la bouche afin de faciliter l'entrée d'air dans les alvéoles au moment de la naissance. Mais des études récentes démontrent qu'il s'agirait plutôt d'une absorption du liquide au niveau de l'espace interstitiel des poumons vers les vaisseaux sanguins, possiblement potentialisée par le

transport ionique, et déclenchée par un processus biochimique précédant le début des contractions utérines (Gowen, 1988; Hales, 1993).

Outre le fait qu'il y ait maturation des systèmes antioxydants pulmonaires peu avant le terme qui semblent préparer le fœtus à la naissance dans un milieu riche en oxygène (Frank, 1984), l'équipe de Metsvaht (1999) avance l'hypothèse que les contractions utérines et un accouchement vaginal sont associés à un stress oxydant pour le nouveau-né et que ce stress peut être important dans le déclenchement de l'activité et la production d'enzymes antioxydantes. Des études épidémiologiques ont clairement démontré une relation entre les différents types d'accouchement et la morbidité néonatale pour des grossesses à terme. Les accouchements par césarienne élective, sans contractions au préalable, sont plus fortement reliés à une morbidité respiratoire du nouveau-né que les accouchements par voie vaginale et/ou par césarienne d'urgence après un début de travail (Annibale, 1995; Hales, 1993; Hook, 1997; Morrison, 1995). Cependant, chez les prématurés, le risque de morbidité n'est pas aussi bien défini et d'autres facteurs liés à la prématurité entrent en ligne de compte (Jonas, 1997).

### 1.5.2 La période néonatale

Suivant la naissance, la maturation des systèmes de défense antioxydante se poursuit et se caractérise par l'activité croissante de certaines enzymes telles que la catalase, la

superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase (Asikainen, 1998; Metsvaht, 1999; Oshiro, 2001). De plus, la bilirubine non conjuguée, produit final de la dégradation de l'hémoglobine présente chez le nouveau-né, jouerait un rôle non négligeable dans la défense antioxydante. Son taux plasmatique se maintient généralement à des concentrations relativement faibles et se traduit par une jaunisse dite physiologique du nouveau-né.

Chez des prématurés atteints du syndrome de détresse respiratoire, on a remarqué qu'un taux élevé de bilirubine était associé à un meilleur état de santé (Benaron, 1991). Outre les données cliniques, des études *in vitro* démontrent l'efficacité antioxydante de la bilirubine par son interaction avec les radicaux libres et l'inhibition des réactions en chaîne générées par ces derniers (McDonagh, 1990). Notamment, une étude de Mireles (1999) met en évidence l'activité antioxydante de la bilirubine sur des érythrocytes de sang de cordon. À des concentrations physiologiques, la membrane, les protéines et l'activité enzymatique membranaire sont protégés contre des stress oxydants en présence de la bilirubine. Antérieurement, l'équipe de Dennery (1995) avait démontré l'efficacité de la bilirubine dans une étude *in vivo* chez des rats. Les rats produisant de la bilirubine à la naissance manifestaient une meilleure défense antioxydante sérique lors d'un stress hyperoxique.

Fait à noter, la bilirubinémie observée chez le nourrisson allaité est souvent plus importante et d'une durée plus longue que chez celui nourri de préparations

commerciales (van Zoeren-Grobbe, 1994). Cependant, une hyperbilirubinémie conjuguée, conséquence d'un métabolisme déficient, est pathologique et peut avoir des conséquences graves chez le nourrisson (Kaplan, 1998; Pashankar, 2000).

### 1.5.3 Les antioxydants du lait maternel

À la naissance, la baisse du taux de progestérone par l'expulsion du placenta et la présence continue de prolactine sont à la source du deuxième stage de la lactogénèse, soit le déclenchement de la production lactée chez la mère (Neville, 2001). Le lait maternel contient, entre autres, les principaux antioxydants tels la catalase, la glutathion peroxydase, l'acide ascorbique et l' $\alpha$ -tocophérol. La lactoferrine qui inhibe la formation de radicaux hydroxyle ainsi que les réducteurs de radicaux libres tels le  $\beta$ -carotène et la L-histidine sont aussi présents (Garofalo, 1999).

Le colostrum, produit par la glande mammaire dans les premiers jours suivant la naissance, possède la qualité d'un environnement réducteur par la présence d'acide ascorbique, d' $\alpha$ -tocophérol et d'acide urique (Buescher, 1988; Buescher, 1992). De plus, son activité enzymatique antioxydante contribue aussi de façon significative à l'effet antioxydant généralement observé dans le lait maternel. Aussi, une étude de Pruitt (1991) identifie l'activité de peroxydases dans le colostrum, contribuant à une défense contre les pathogènes, dont la majeure partie serait due à la myéloperoxydase provenant des neutrophiles et une autre partie provenant probablement d'une

lactoperoxydase. Cependant, l'environnement réducteur du colostrum permet de rééquilibrer cette action oxydative.

Plus spécifique à la défense antioxydante, la présence de glutathion peroxydase (GPX) dans le colostrum semble jouer un rôle protecteur au niveau de la peroxydation des acides gras polyinsaturés présents dans le lait maternel (Dodge, 1998). Cette même équipe a aussi noté que la concentration en GPX diminuait dans le temps, le lait mature contenant moins de cette peroxydase que le colostrum. Ce fait a également été mis en évidence dans une autre étude qui comparait le lait de mères ayant accouché à terme ou avant terme et qui mettait en parallèle la quantité de GPX retrouvée dans le plasma des nouveau-nés. À la naissance, les prématurés avaient une activité GPX plasmatique moins importante que chez les bébés nés à terme mais la quantité de peroxydase dans le lait des mères de prématurés restait cependant plus élevée dans le lait mature (trois semaines de vie) que celles ayant accouché à terme (Ellis, 1990).

Ces données sur les antioxydants contenus dans le colostrum et le lait maternel correspondent à celles d'études comparatives qui démontrent que les nouveau-nés nourris exclusivement au sein ou avec des formules fortifiées de lait maternel ont une capacité antioxydante supérieure à celle des nourrissons qui n'ont reçu que des préparations commerciales spécifiques pour les nouveau-nés à terme ou prématurés. La capacité antioxydante est démontrée soit par la mesure de molécules antioxydantes dans le plasma des nourrissons (Ostrea, 1986; van Zoeren-Grobbe,

1994) ou encore par l'expiration d'éthane et de pentane qui sont des indicateurs de peroxydation des acides gras  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 respectivement (Wispe, 1985).

La capacité du lait maternel à accroître la défense antioxydante des nouveau-nés est aussi mise en évidence dans des études épidémiologiques. Une étude américaine portant sur des prématurés a démontré que les enfants nourris de formules fortifiées de lait maternel avait une moindre incidence de morbidité due à l'entérocolite nécrosante, cette dernière pouvant être associée à une capacité antioxydante déficiente ou immature chez les nouveau-nés (Schanler, 1999).

#### 1.6 Le rôle du glutathion

En ce qui concerne la défense antioxydante, le glutathion (GSH) représente le système cellulaire le plus important; sa concentration intracellulaire est relativement élevée (0,2-10 mM) et il est présent dans la presque totalité des cellules (Anderson, 1998). La cellule peut exporter le glutathion dans le milieu extracellulaire mais on l'y retrouve en concentration plus faible, par exemple de l'ordre du  $\mu$ M dans le plasma (Meister, 1983; Shan, 1990). Outre son action d'antioxydant et d'agent réducteur, le glutathion est considéré comme un réservoir de cystéine et est impliqué, entre autres, dans le métabolisme de différents composés cellulaires ainsi que dans la synthèse de prostaglandines, de protéines et d'ADN. Il contribue également aux réactions de

détoxication des xénobiotiques, à la régulation du cycle cellulaire ainsi qu'à la thermorégulation (Deneke, 1989; Meister, 1983).

La synthèse de ce tripeptide, formé d'acide glutamique (L-Glu), de cystéine (L-Cys) et de glycine (Gly), requiert deux réactions nécessitant de l'ATP. La première réaction (1) catalysée par la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase réunit l'acide glutamique à la cystéine et la deuxième réaction (2) joint la glycine au premier dipeptide ( $\gamma$ -glutamylcystéine) par la glutathion synthétase.



Aussi, le glutathion lui-même peut autoréguler sa synthèse par son effet inhibiteur sur la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase (Anderson, 1998).

La fonction antioxydante du glutathion se situe principalement au niveau de son cycle d'oxydoréduction où la GSH peroxydase joue un rôle central en réduisant des hydroperoxydes ou des peroxydes lipidiques tout en oxydant le GSH en GSSG. Les peroxydes intracellulaires sont des amplificateurs dans les réactions de formation de radicaux libres et en diminuant leur concentration, la cellule évite la présence d'une trop grande quantité de radicaux libres pouvant mener à un stress oxydant. L'oxydation du GSH peut se faire aussi de façon non enzymatique en présence d'oxygène ( $\text{O}_2$ ) ou de radicaux libres. Finalement, le cycle d'oxydoréduction

maintient le ratio GSSG/GSH à des niveaux acceptables (par exemple, 0,15-0,25 dans les érythrocytes), le GSSG étant en concentration plus faible que le GSH. Un ratio plus élevé peut être un indicateur de stress oxydant (Meister, 1983; Meister, 1991; Németh, 1994; Shan, 1990). La figure 1 résume les différents aspects de la fonction antioxydante du glutathion.

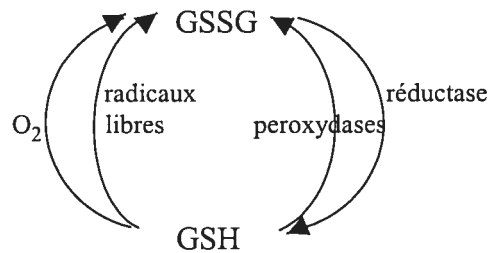


Figure 1. Cycle d'oxydoréduction du glutathion.

Le GSSG est la forme oxydée du glutathion et le GSH, sa forme réduite. La réductase régénère le GSH à partir du GSSG dans une réaction nécessitant du NADPH. Les peroxydases peuvent être dépendantes du sélénium (Se) ou non et libèrent des molécules de H<sub>2</sub>O. Le GSH réduit les radicaux libres et l'oxygène par transfert d'ions hydrogène.

Étant donné qu'un stress oxydant peut être soit la cause, soit la conséquence de bas niveaux en glutathion intracellulaire, une augmentation de la concentration de ce dernier pourrait être efficace afin de contrer les effets délétères reliés à l'oxydation. En général, ce système de défense peut être amélioré chez l'animal et dans des modèles *in vitro* par l'ajout de différents substrats pouvant contribuer directement ou indirectement à l'augmentation de sa concentration intracellulaire (Anderson, 1998).



Le glutathion lui-même ne semble pas être transporté intégralement à l'intérieur de la cellule de façon significative; il est plutôt dégradé dans le milieu extracellulaire et les acides aminés ainsi libérés sont transportés et peuvent être utilisés à la synthèse du glutathion intracellulaire. Les esters de GSH (monoester ou diester) sont transportés de façon plus efficace et sont, par la suite, hydrolysés en GSH dans le milieu intracellulaire ayant pour effet de hausser la quantité de glutathion (Mårtensson, 1990; Meister, 1991; Singhal, 2000). Une autre façon d'augmenter le glutathion intracellulaire consiste à éviter la voie de la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase (première enzyme du cycle de synthèse) puisque cette dernière peut être inhibée par le GSH lui-même; un apport direct du dipeptide  $\gamma$ -glutamylcystéine s'avère donc efficace puisqu'il est transporté par la transpeptidase membranaire et directement utilisé par la glutathion synthétase (Anderson, 1998; Deneke, 1989).

Enfin, la concentration intracellulaire de glutathion peut être accrue par un apport d'acides aminés. L'acide glutamique et la glutamine (source d'acide glutamique) sont habituellement en concentration largement suffisante pour ne pas limiter la synthèse de glutathion tout comme la glycine bien que cette dernière soit présente en moins grande quantité (Deneke, 1989). Cependant, la cystéine étant un facteur limitant et pouvant être utilisé à d'autres synthèses, la disponibilité de cet acide aminé peut être critique pour la concentration intracellulaire de glutathion. Un apport de cystéine — direct ou sous forme de méthionine, de L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate (OTC) ou de N-acétylcystéine (NAC), ces derniers étant des précurseurs métabolisés en

cystéine dans la cellule — peut augmenter de façon significative la quantité de glutathion (Anderson, 1998; Bray, 1994; Deneke, 1989; Leaf, 1994; Rahman, 2000).

Chez les nouveau-nés, le ratio GSSG/GSH plasmatique est un peu plus élevé que chez les adultes (Thibeault, 2000). Cependant, on dénote chez les prématurés des concentrations en GSH plus basses que chez les enfants nés à terme, entraînant souvent des ratios plus élevés (Jain, 1995; Lavoie, 1997). Knapen (1999) a, de plus, observé que la concentration en glutathion dans le sang de cordon ombilical était plus basse chez les nouveau-nés ayant souffert d'une asphyxie lors de la naissance. Plus particulièrement chez les prématurés qui développent des pathologies citées comme étant reliées à des stress oxydants (le syndrome de détresse respiratoire, la dysplasie bronchopulmonaire et la rétinopathie de prématurité), différentes équipes ont remarqué soit des hausses de la concentration en GSSG ou des baisses de la concentration en GSH, ce qui augmente dans les deux cas le ratio GSSG/GSH par rapport à des enfants nés à terme ou sans complication néonatale. De plus, un degré élevé d'immaturité était souvent associé à des changements en GSH ou GSSG plus marqués (Lavoie, 1997; Németh, 1994; Papp, 1999).

Enfin, une baisse de concentration en GSH a été notée dans les érythrocytes chez des nourrissons atteints de SDR et de DBP après 28 jours de thérapie, ce qui pourrait indiquer un stress dû à une thérapie prolongée en oxygène (Moison, 1997). En contrepartie, des études chez les animaux et dans des tissus pulmonaires fœtaux

humains démontrent qu'une exposition à de fortes concentrations en oxygène semble stimuler la défense antioxydante par l'augmentation de la concentration cellulaire en glutathion ainsi que par l'activité accrue d'enzymes antioxydantes (Chessex, 1999; Warshaw, 1985).

D'autre part, des différences dans le système glutathion ont été notées entre les garçons et les filles. Dans une étude épidémiologique réalisée en Malaisie, on a mesuré la concentration en GSH ainsi que l'activité de la GSSG réductase et celle de la GSH peroxydase chez des nouveau-nés à terme et en santé. Les auteurs rapportent une concentration plus élevée en GSH et en GSH peroxydase, dénotant une activité plus importante du système glutathion, dans les globules rouges de sang de cordon provenant de filles (Lie-Injo, 1973). De même, Lavoie (1997; 1998) a démontré une concentration plus élevée en GSH dans les leucocytes d'aspirats trachéaux et une activité de synthèse de glutathion plus importante dans les leucocytes de sang de cordon chez les filles nées à terme que chez des garçons nés à terme. De telles données biochimiques peuvent être mises en parallèle avec l'incidence de morbidité et de mortalité plus élevée chez les garçons nouveau-nés, ces derniers étant plus souvent affectés de désordres respiratoires que les filles (Malloy, 2000; Naeye, 1971; Perelman, 1986; Rubaltelli, 1998).

### 1.7 Hypothèse de travail

On rapporte dans la littérature que l'incidence de certaines pathologies est plus élevée chez les garçons que chez les filles en période néonatale, qu'il s'agisse de nouveau-nés prématurés ou à terme. Par exemple, la dysplasie bronchopulmonaire, pathologie souvent liée à une charge oxydante augmentée par une thérapie d'oxygénation, semble affecter plus souvent les nouveau-nés mâles (Byrne, 2002; Corcoran, 1993). De plus, la défense antioxydante cellulaire à la naissance paraît mieux développée chez les filles que chez les garçons (Lavoie, 1997; Lavoie, 1998; Lie-Injo, 1973). Sur la base de ces données, une différence dans la maturation intra-utérine de certains antioxydants entre les garçons et les filles pourrait être suggérée.

D'autre part, des études sur la maturité cellulaire ainsi que sur le vieillissement des cellules en culture ont permis d'établir des indices sur la capacité des cellules à se reproduire ou à induire la synthèse de certaines protéines (Gimbrone, 1974; Hasegawa, 1988; Ranta, 1997). Chez les nouveau-nés, les cellules du cordon ombilical pourraient afficher certaines caractéristiques de prolifération *in vitro* selon le genre et ce même type de cellules pourrait indiquer la maturité du système de défense antioxydante des nouveau-nés et particulièrement le système intra-cellulaire du glutathion.

En considération de ces éléments, l'hypothèse de travail principale de la présente étude est que le genre a un effet sur la prolifération des cellules ombilicales et que celle-ci se reflète dans une utilisation préférentielle de la cystéine vers la synthèse protéique ou vers la synthèse du glutathion.

Dans un premier temps, afin de vérifier l'effet du genre sur la maturité des tissus fœtaux, nous établirons des courbes de prolifération cellulaire pour des cultures de cellules du cordon ombilical (HUVEC) provenant de nouveau-nés à terme. En effet, les caractéristiques de vieillissement des cellules *in vitro* semblent être le reflet des caractéristiques *in vivo*, c'est-à-dire, entre autres, un potentiel de croissance diminué, une diminution du nombre de cellules par unité de surface et une augmentation du nombre de cellules multinuclées, toutes pouvant affecter la vitesse de prolifération cellulaire (Hasegawa, 1988). L'hypothèse statistique nulle à tester est que la prolifération cellulaire, mesurée par incorporation de thymidine, est la même pour les cultures provenant de cellules de filles que celles provenant de garçons.

Dans un deuxième temps, nous vérifierons si la maturation est caractérisée par une maturité de la défense antioxydante en déterminant la concentration en glutathion dans les HUVEC en culture. En général, la concentration intra-cellulaire en glutathion est plus élevée chez les nouveau-nés lorsque la grossesse a été menée à terme (Jain, 1995; Lavoie, 1997). De plus, Lavoie (1997) a démontré que la concentration en glutathion dans les cellules d'aspirats trachéaux était plus élevée

chez les filles que chez les garçons. L'hypothèse statistique nulle à tester est que la concentration intra-cellulaire en glutathion est la même pour des cellules provenant de filles ou de garçons de même âge gestationnel.

Finalement, l'effet de l'apport de cystéine sur la concentration intra-cellulaire en glutathion sera déterminée dans ces mêmes cultures de HUVEC. Nous testerons d'abord l'hypothèse nulle que la cystéine est utilisée pour la synthèse de glutathion autant dans les cultures cellulaires provenant de filles que celles provenant de garçons. Cet acide aminé est un facteur limitant de la synthèse du glutathion mais peut aussi être utilisé pour la synthèse protéique des cellules en croissance; la disponibilité de cet acide aminé peut ainsi être critique pour la concentration intra-cellulaire de glutathion (Anderson, 1998; Bray, 1994; Deneke, 1989). Dans un deuxième temps donc, l'hypothèse statistique nulle à tester est que la cystéine est utilisée pour la synthèse du glutathion autant au moment de la phase logarithmique de la prolifération qu'à confluence.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

## 2.1 Culture cellulaire

Les cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical (HUVEC) est le modèle utilisé pour la présente étude. Les cordons ombilicaux de nouveau-nés à terme, provenant de césariennes électives sauf un d'un accouchement par voie vaginale, ont été récoltés à la maternité de l'hôpital Sainte-Justine, Montréal, entre mai 1999 et septembre 2000.

Les HUVEC ont été isolées par la méthode de Jaffe (1973). Sur une portion d'environ 10 cm du cordon, exempte de ponction ou de trace de pince ombilicale, trois (3) ml d'une solution à 0,5 % de collagénase A (Boehringer Mannheim, Allemagne) préparée dans un tampon phosphate pour cordon (0,001 M, pH 7,4, additionné de NaCl 0,14 M et de D-glucose 0,011M) ont été injectés dans la veine. La portion du cordon a ensuite été incubée au bain-marie dans la solution tampon pour cordon à 37°C pendant 15 minutes. Les cellules ont été récoltées dans un tube contenant 10 ml de milieu M199 supplémenté à 20 % de sérum de veau fœtal (FBS) contenant 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (GibcoBRL, NY, USA).

Les HUVEC ont été incubées à 37°C (5 % CO<sub>2</sub>), à raison de 150 000 cellules/ml/puits dans des plaques de culture (puits de 15 mm de diamètre) (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA) dans un milieu M199 supplémenté et additionné de 10 µl/ml d'un facteur de croissance pour cellules endothéliales (ECGF) (Sigma, MO,



USA). Les cultures sélectionnées étaient exemptes de contamination par des cellules de type fibroblaste et présentaient une bonne capacité de prolifération.

Un premier passage a été effectué au moment où les cultures atteignaient une sous-confluence (entre deux et quatre semaines en moyenne) afin d'uniformiser les temps de culture. Pour ce faire, les cellules ont été incubées à 37°C (5 % CO<sub>2</sub>) pendant 15 minutes dans une solution de collagénase A à 0,1 % préparée dans le tampon pour cordon (1 ml/puits), récupérées par la suite dans du milieu M199 supplémenté et divisées (à raison de 1 puits pour 4) dans des plaques de culture. La collagénase est utilisée à plus faible concentration afin d'éviter d'altérer la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (GGT) qui se retrouve à la surface de la membrane, enzyme nécessaire au cycle du glutathion.

## 2.2 Analyse de la prolifération

La prolifération cellulaire a été déterminée par incorporation de thymidine selon une méthode modifiée de Gimbrone (1974). La thymidine est un bon indicateur de l'activité mitotique puisqu'elle s'incorpore à l'ADN nouvellement formé. En début de culture, l'incorporation est minimale car il y a relativement peu de cellules. S'ensuit une augmentation exponentielle du nombre de cellules par division cellulaire maximale par rapport à la surface du support de culture. Par la suite, il y a une chute

dans le taux d'incorporation lorsque la division cellulaire est limitée par l'espace disponible (Cook, 1989).

Sur une durée de sept jours, les HUVEC de premier passage ont été exposées à 1  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^3\text{H}$ ]thymidine (Amersham, IL, USA) ajouté au milieu non supplémenté pendant quatre (4) heures chaque jour, à intervalles réguliers de 24 heures. Les cultures ont été incubées à  $37^\circ\text{C}$  (5 %  $\text{CO}_2$ ) pendant les traitements. Les cellules ont été maintenues en culture avec du milieu supplémenté et celui-ci a été renouvelé au quatrième jour pour les cultures des jours 5 à 7.

Pour chacun des jours, les cellules (provenant de cinq puits) ont été lavées deux fois avec un tampon phosphate (PBS) et récoltées par grattage puis récupérées dans 300  $\mu\text{l}$  de PBS à pH 7,4. Après congélation/décongélation, un aliquot de 20  $\mu\text{l}$  a servi à la détermination de la radioactivité intégrée dans chacun des cinq lysats cellulaires par scintillation liquide (Beckman LS 6000IC, CA, USA), exprimée en CPM (compte par minute). La quantité de radioactivité incorporée dans les cellules était inversement proportionnelle à celle détectée dans le surnageant (milieu de culture), et la somme des deux quantités correspondait à la radioactivité totale dans le milieu avant incubation.

Le reste du lysat cellulaire (150  $\mu\text{l}$ ) a été traité avec 50  $\mu\text{l}$  d'hydroxyde d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{OH}$  1 N) pendant 10 minutes à  $37^\circ\text{C}$  afin de libérer l'ADN des protéines nucléaires pouvant interférer dans la liaison du colorant Hoechst (Downs, 1983). Une

quantité de 10 µl de cette solution a été analysée et les unités de fluorescence ont été rapportées sur une courbe standard d'ADN de thymus de veau afin d'estimer l'ADN présent. La quantité d'ADN a été déterminée par spectrofluorométrie avec une excitation à 360 nm et une émission à 460 nm (Perkin Elmer LS 50, England) à l'aide du colorant Hoechst 33258 (BIO-RAD, CA, USA).

### 2.3 Détermination du glutathion intracellulaire

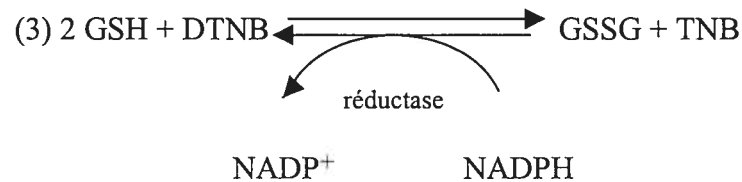
Les cultures de premier passage ont été incubées à 37°C (5 % CO<sub>2</sub>) dans du milieu M199 supplémenté (FBS, ECGF) pendant sept (7) jours avec un changement de milieu au 4<sup>e</sup> jour de culture. Au jour 8, les cellules (cinq puits) ont été traitées avec un milieu M199 non supplémenté contenant de la cystéine-HCl à 0,5 mM (Sigma, MO, USA) pendant quatre (4) heures. L'acide chlorhydrique (HCl) maintient la cystéine sous forme réduite dans le milieu pour éviter que celle-ci s'oxyde spontanément en cystine tout en formant du peroxyde d'hydrogène (Anderson, 1987). La concentration utilisée de cystéine-HCl n'a pas d'effet sur le pH du milieu de culture. Chaque culture individuelle comportait un contrôle (M199 non supplémenté) afin de pouvoir mesurer l'effet d'un apport de cystéine. Le milieu non supplémenté lors des traitements a été préféré à celui supplémenté puisque la composition en protéines du sérum bovin fœtal (FBS) peut varier selon le lot.

Après incubation, les cellules ont été récoltées dans 500  $\mu$ l de PBS puis lysées par sonification. Un aliquot de 100  $\mu$ l a été mis de côté pour le dosage des protéines selon la méthode de Bradford (1976); les protéines ont été diluées dans une proportion de 1:1 avec du NaOH 1 N pendant 18 heures à 4°C puis colorées par le bleu de Coomassie (BIO-RAD, CA, USA). La densité optique des échantillons a été mesurée à 595 nm par spectrophotométrie (Beckman DU-6, CA, USA) et les résultats ont été rapportés sur une courbe standard d'albumine de sérum bovin (BSA) (Boehringer Mannheim, Allemagne) pour établir la quantité de protéines présente.

Les 400  $\mu$ l restant du lysat ont été traités avec 400  $\mu$ l d'une solution d'acide sulfosalicylique (ASS) à 3 % (Aldrich Chemical, WI, USA) pendant 15 minutes à 4°C. Cette préparation consiste à inhiber l'action de la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (GGT) par déprotéinisation, la GGT étant l'enzyme responsable de la dégradation du GSH (Roberts, 1993). Après centrifugation (deux minutes à 10 000 rpm), le surnageant a été récolté pour le dosage du glutathion. Ce dernier a été déterminé par la méthode de Griffith (1980). Les substrats (acide dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB), NADPH) et l'enzyme GSSG réductase ont été préparés dans un tampon Tris-HCl 250 mM, pH 7,6 afin de contrer l'effet inhibiteur de l'ASS sur la GSSG réductase (Allen, 1987) ainsi que celui du PBS (observation personnelle).

Brièvement, 100  $\mu$ l de l'échantillon à doser est incubé avec 100  $\mu$ l de DTNB 6 mM (Aldrich Chemical, WI, USA) et 600  $\mu$ l de NADPH 0,3 mM (Boehringer Mannheim,

Allemagne). Par la suite, en présence de 20  $\mu$ l (12 U) de GSSG réductase (Boehringer Mannheim, Allemagne), le DTNB est réduit en TNB (acide 2-nitro-5-thiobenzoïque) et la densité optique de celui-ci est mesurée à 412 nm pendant cinq (5) minutes. Une cinétique est établie et comparée à une courbe standard de GSSG, préparée dans une solution de PBS et d'ASS à 3 % (1 : 1) pour obtenir des conditions identiques aux échantillons, afin de déterminer la quantité de GSH (2 fois celle du GSSG) dans l'échantillon. La mesure est basée sur la concentration en GSSG puisqu'elle est plus élevée que celle du GSH, la réaction enzymatique par la peroxydase étant relativement plus rapide. La réaction (3) détaille le processus de détection du glutathion.



#### 2.4 Incorporation de cystéine

Certaines cultures, traitées avec les mêmes conditions que précédemment, ont été exposées à de la cystéine radioactive pendant quatre (4) heures. Une quantité équivalente à 1  $\mu$ Ci/ml de  $^{35}\text{S}$ -cystéine-HCl a été ajoutée au milieu de culture contenant de la cystéine. De plus, les cellules ont subi un traitement avec BSO (M199 additionné de 1,0 mM de DL-buthionine-[S,R]-sulfoximine (Sigma, MO, USA)) pendant quatre (4) heures avec ou sans traitement subséquent avec la cystéine

radioactive. Le BSO abaisse le glutathion intracellulaire par inhibition de la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase (Griffith, 1979), première enzyme de synthèse du glutathion qui adjoint l'acide glutamique à la cystéine. Cette dernière, suite à l'inhibition de l'enzyme, pourrait être utilisée par d'autres mécanismes cellulaires.

L'incorporation de cystéine a été évaluée aux jours 6 (sous-confluence) et 8 (confluence) des cultures. Ces temps de culture ont été déterminés *a priori* considérant qu'après une semaine les cellules forment une monocouche confluyente (Gimbrone, 1974). La préparation des cellules pour le dosage des protéines et du glutathion reste la même. Après lavage et récolte des cellules, la radioactivité a été comptée en désintégration par minute (DPM) par scintillation liquide (Beckman LS 6000IC, CA, USA) dans le surnageant cellulaire et dans le culot de protéines. Par la suite, la valeur de la radioactivité est transformée en vitesse d'intégration de la cystéine (pmoles de cystéine/ $\mu$ g de protéine/4 heures) à partir de la radioactivité détectée dans le milieu avant l'incubation et correspondant à 0,5 mM de cystéine ( $x$  DPM = 0,5 mM de cystéine; par règle de trois et connaissant  $x$ , la quantité de cystéine est calculée à partir de la valeur obtenue en DPM pour chacun des échantillons).

## 2.5 Analyse statistique

Les analyses ont été réalisées sur le logiciel statistique SPSS 10.0.5 (SPSS Inc., IL, USA).

La prolifération cellulaire a été évaluée sur une courbe logistique en rapportant la quantité d'ADN par jour de culture. Le maximum d'incorporation de thymidine, déterminé par une régression polynomiale de deuxième ordre, a été rapporté en quantité d'ADN et cette dernière a servi à établir un indice de prolifération exprimé en jour sur la courbe logistique. Les indices de prolifération ont été comparés par test de t.

Une analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour différencier les traitements sur les mesures de glutathion ainsi que sur l'incorporation de cystéine.

### 3. RÉSULTATS



Pour l'ensemble des données incluses dans les analyses, la durée de gestation moyenne était de 39 semaines, tant chez les filles que chez les garçons, et le poids moyen des nouveau-nés était de  $3735 \pm 117$  (g  $\pm$  s.e.m.). Les filles (n = 9) avaient un poids de  $3466 \pm 177$  (g  $\pm$  s.e.m.) et les garçons (n = 9) un poids de  $4004 \pm 95$  (g  $\pm$  s.e.m.). La différence de poids entre garçons et filles est significative ( $p < 0,05$ ).

### 3.1 Prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire *in vitro* des cellules de la veine du cordon ombilical a été évaluée quotidiennement par incorporation de thymidine tritiée sur une période de sept jours. La prolifération cellulaire pour les cultures provenant de filles (n = 5) et celles de garçons (n = 6) sont présentées aux figures 2 et 3, à la page 37. Les points représentent la quantité moyenne d'ADN par jour de culture et les bâtons de variation sont l'erreur type de la moyenne. Afin de pouvoir vérifier si les deux genres se comportent de la même façon en culture, une fonction logistique a été ajustée sur les données. Ce type de fonction est largement utilisé et adapté pour les phénomènes de croissance de population sur un substrat à espace limitant, la population étant, dans ce cas-ci, les cellules en culture (Bates, 1988). Les données sont ajustées sur une fonction logistique  $Y = 1/(1/U + (b_0 \times (b_1^t)))$  où U est la limite supérieure imposée (1000 pour les HUVEC de filles et 1500 pour celles de garçons, déterminées à partir des données),  $b_0$  est la constante calculée,  $b_1$  est le coefficient de régression et t, le temps en jour (d) de culture. Les courbes de croissance ajustées sont présentées à la

figure 4, page 38. Le degré d'ajustement de la fonction logistique ( $r^2$ ) est élevé dans les deux cas;  $r^2 = 0,9579$ ,  $p = 0,0001$  dans le cas des filles et  $r^2 = 0,6915$ ,  $p = 0,0126$  pour les garçons. Les intervalles de confiance (95 %) pour chacun des jours de cultures sont plus grands pour les cultures de garçons que celles des filles, d'où le  $r^2$  plus élevé pour ces dernières. De plus, afin de vérifier si l'ajustement d'une fonction logistique est approprié pour les données récoltées, un test statistique sur le coefficient de régression  $b_1$  a été effectué. L'hypothèse nulle de ce test consiste à vérifier si  $b_1 = 0$ . Le test calculé,  $z^* = b_1/s\{b_1\}$ , sera comparé à la valeur  $z = 1,960$  pour un  $\alpha = 0,05$ . Pour la courbe provenant des HUVEC de filles,  $z^* = 26,24$  et pour celle provenant des garçons,  $z^* = 7,82$ . Dans les deux cas, l'hypothèse nulle est rejetée puisque que  $z^* > 1,960$ ,  $b_1$  étant donc significativement plus grand que 0, ce qui confirme que l'ajustement d'une fonction logistique est appropriée. Aussi, les coefficients de régression  $b_1$  ne sont pas significativement différents entre les deux courbes puisque les intervalles de confiance (95 %) calculés pour chacun se chevauchent ( $-0,5924 < b_1 < 0,6880$  pour les filles et  $-0,4608 < b_1 < 0,7690$  pour les garçons). La prolifération cellulaire se comporte donc sensiblement de la même façon pour les deux types de culture. Cependant, la vitesse de prolifération est plus rapide pour les cultures de garçons due aux coefficients  $b_0$  et  $b_1$  plus faibles et que le plateau supérieur, défini selon la fonction de la courbe, débute à un niveau d'ADN plus élevé que pour les cultures de filles.

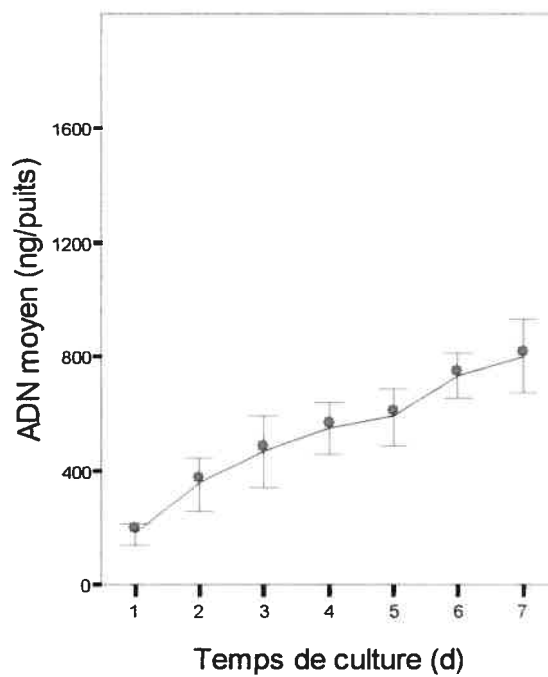


Figure 2. Prolifération cellulaire pour les HUVEC provenant de filles.

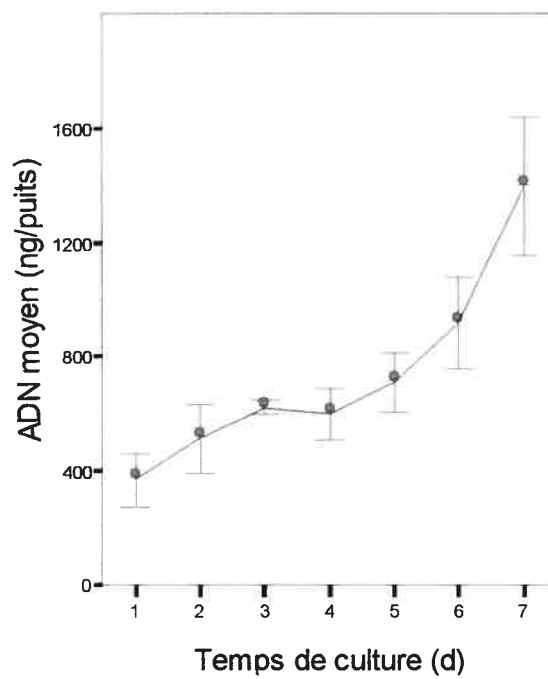


Figure 3. Prolifération cellulaire pour les HUVEC provenant de garçons.

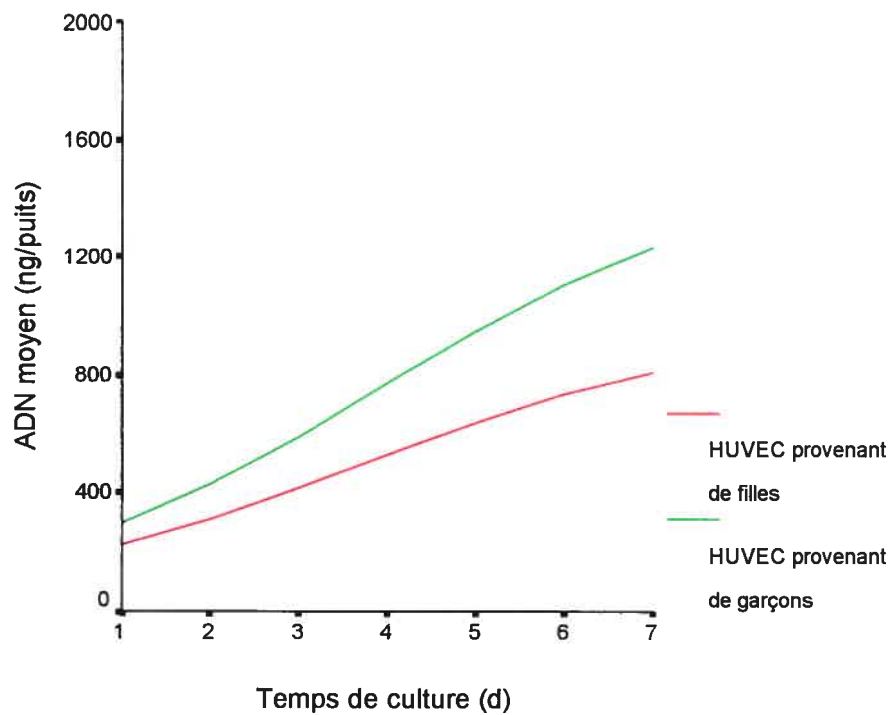


Figure 4. Ajustement d'une fonction logistique sur les courbes de prolifération cellulaire.

Pour les HUVEC provenant de garçons, l'équation est la suivante :

$$Y = 1/(1/1500 + (0,0044 \times (0,6149^t))), r^2 = 0,6915, p = 0,0126.$$

Pour les HUVEC provenant de filles, l'équation est la suivante :

$$Y = 1/(1/1000 + (0,0053 \times (0,6402^t))), r^2 = 0,9579, p = 0,0001.$$

Afin de vérifier s'il existe une différence significative dans la vitesse de prolifération entre les deux types de culture, des courbes d'incorporation de thymidine ont été établies en fonction de la quantité d'ADN présente pour chaque jour de culture.

Les régressions quadratiques présentées aux figures 5 et 6, pages 40 et 41 respectivement, sont ajustées en rapportant la radioactivité détectée dans les lysats cellulaires sur la quantité d'ADN. La quantité moyenne d'ADN sur les 7 jours de culture a été calculée pour chacun des deux types de culture (filles et garçons) et soustraite des données moyennes pour chaque jour afin d'obtenir des données centrées réduites dans le but d'éliminer la multicollinéarité (entre  $X$  et  $X^2$ ) lors de l'analyse.

Les paramètres de la fonction quadratique calculée,  $Y = b_0 + b_1X + b_2X^2$ , ont été transformés afin de retrouver l'équation  $Y' = b'_0 + b'_1 \bar{X} + b'_2 \bar{X}^2$  sur les valeurs originales;  $b'_2 = b_2$ ,  $b'_1 = b_1 - 2b_2 \bar{X}$  et  $b'_0 = b_0 - b_1 \bar{X} + b_2 \bar{X}^2$  où  $\bar{X}$  est la moyenne de la quantité d'ADN sur les 7 jours de culture. Au maximum d'incorporation de thymidine (point d'inflexion calculé selon l'équation obtenue), la quantité d'ADN diffère entre les deux types de culture; 519,8 ng (401,3 ng-635,1 ng, IC 95 %) pour les cultures provenant de filles et 1477,9 ng (1352,0 ng-1496,9 ng, IC 95 %) pour celles des garçons.

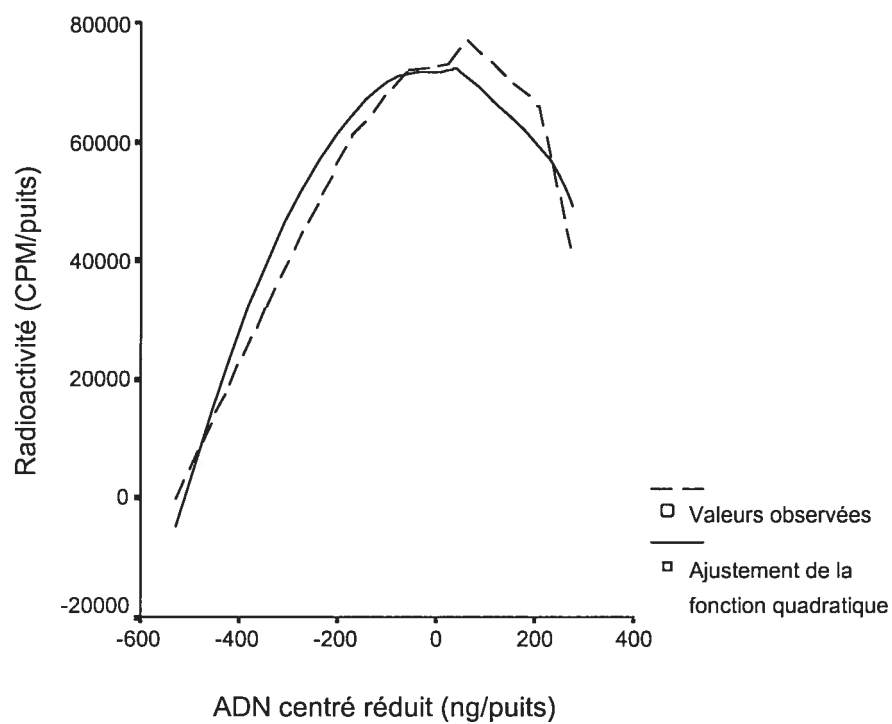


Figure 5. Courbe d'incorporation de thymidine en fonction de la quantité d'ADN présente dans les cultures de HUVEC provenant de filles.

L'équation sur les valeurs originales de l'ADN est la suivante :  $Y' = -3405,10 + 291,08X - 0,28X^2$ ,  $r^2 = 0,9288$ ,  $p = 0,0006$ . Le point d'inflexion se situe à 519,8 ng.

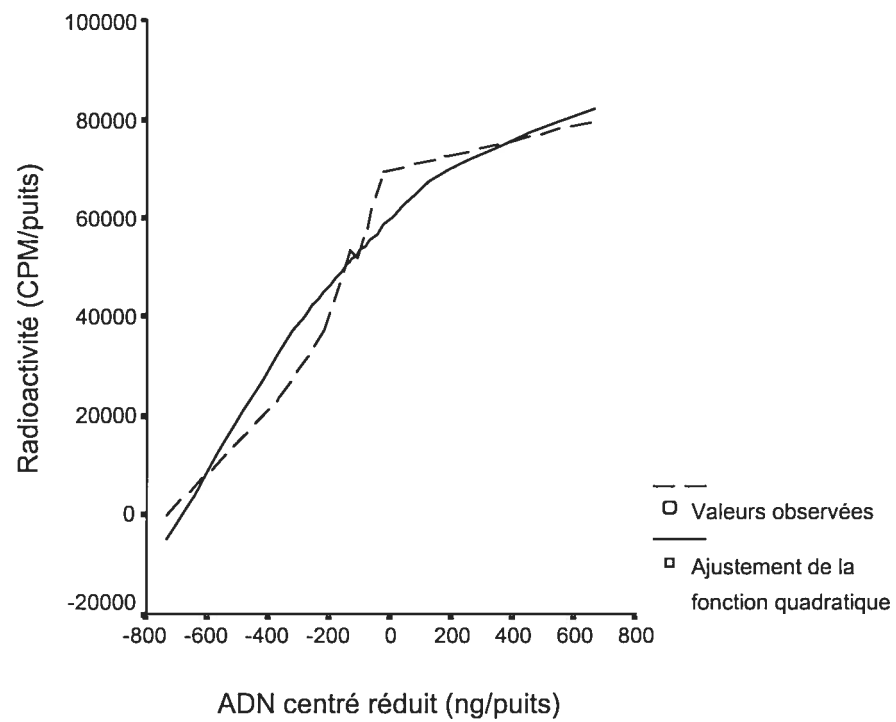


Figure 6. Courbe d'incorporation de thymidine en fonction de la quantité d'ADN présente dans les cultures de HUVEC provenant de garçons.

L'équation sur les valeurs originales de l'ADN est la suivante :  $Y' = -5239,29 + 118,23X - 0,04X^2$ ,  $r^2 = 0,9143$ ,  $p = 0,0009$ . Le point d'inflexion se situe à 1477,9 ng.

Le tableau III à la page 43 résume les résultats obtenus pour la prolifération cellulaire. Au maximum d'incorporation de thymidine, les quantités d'ADN diffèrent significativement entre les cultures de filles et celles de garçons; 519,8 ng et 1477,9 ng respectivement ( $p < 0,05$ ). Ces quantités d'ADN, lorsque rapportées sur les courbes logistiques de prolifération cellulaire, correspondent environ au 4<sup>e</sup> jour de culture pour les cellules de filles tandis que pour celles des garçons, ce moment se situerait vers le 12<sup>e</sup> jour de culture. De plus, les quantités d'ADN au 1<sup>er</sup> jour de culture ne diffèrent pas statistiquement ( $F_{(0,95; 1,8)} = 3,46, p = 0,1$ ) et non plus au 7<sup>e</sup> jour de culture ( $F_{(0,95; 1,8)} = 4,57, p = 0,065$ ).

Cependant, la faible différence au jour 1 est aléatoire puisque les cultures utilisées dérivent d'un premier passage où les puits des cultures primaires étaient divisées (1 : 4) après avoir atteint une sous-confluence. Les HUVEC provenant de garçons incorporent donc la thymidine différemment des cellules provenant de filles, dénotant une vitesse de prolifération plus rapide chez ce premier type de culture. Cette différence pourrait avoir une conséquence sur la quantité d'ADN observée au jour 1, sur la synthèse protéique, ainsi que sur la synthèse du glutathion intracellulaire.



Tableau III . Indices de prolifération cellulaire des HUVEC

	Maximum d'incorporation de thymidine		Quantité d'ADN (ng/puits)	
	ADN (ng)*	Temps de culture (d)*	Jour 1	Jour 7
Filles (n = 5)	519,8 (401,3-635,1)	3,9 (2,8-5,0)	181,7 ±37,6	804,9 ±131,1
Garçons (n = 6)	1477,9 (1352,0-1496,9)	12,5 (8,4-16,6)	367,8 ±92,8	1395,9 ±243,2

\*p < 0,05

### 3.2 Concentration intracellulaire en glutathion total et effet de la cystéine

Après une semaine de culture, les cellules ont été incubées avec du milieu contenant ou non de la cystéine. Le Km de la cystéine étant de 0,35 mM pour l'activité de la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase, une concentration de 0,5 mM a été utilisée afin de s'assurer d'une quantité disponible suffisante pour la synthèse du glutathion. La concentration intracellulaire basale en glutathion, sans ajout de cystéine, dans les HUVEC en culture ne diffère pas entre filles (n = 7) et garçons (n = 8);  $30,3 \pm 4,4$  et  $30,6 \pm 5,9$  nmoles/mg de protéine respectivement. La concentration en GSH mesurée dans les cellules provenant de l'accouchement vaginal n'a pas d'influence statistique sur l'ensemble des données (mesurée par les valeurs influentes détectées par les boîtes à moustaches et la distance de Cook (16 %, en deçà du 50 % limitant)).

Pour les cultures où le matériel cellulaire était suffisant pour mesurer à la fois le glutathion intracellulaire basal et celui en présence de cystéine, les résultats sont présentés à la figure 7. L'analyse de variance considérant le genre et la présence ou non de cystéine dans le milieu de culture ne détecte pas de différence significative dans la concentration de GSH ( $F_{(0,95; 3,19)} = 1,162$ ,  $p = 0,355$ ). En présence de cystéine, la concentration en GSH était de  $45,8 \pm 8,9$  nmoles/mg de protéine comparée à la concentration basale de  $41,0 \pm 3,9$  nmoles/mg de protéine dans les cultures provenant de filles et de  $29,3 \pm 4,9$  vs  $32,1 \pm 6,6$  nmoles/mg de protéine dans celles provenant de garçons. La concentration en glutathion intracellulaire en présence de cystéine n'est pas significativement différente entre les deux genres ( $F_{(0,95; 1,8)} = 3,116$ ,  $p = 0,116$ ).

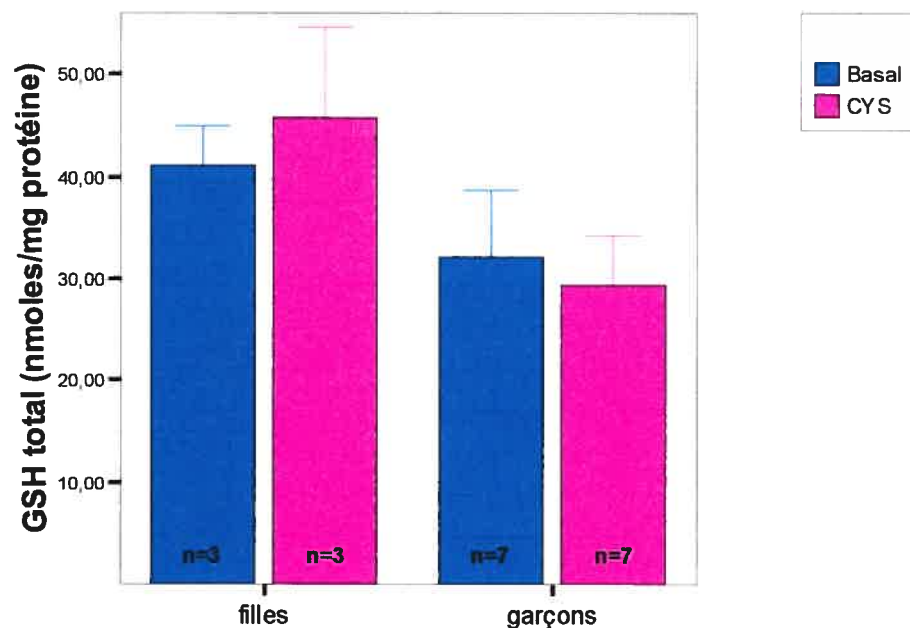


Figure 7. Concentration intracellulaire en glutathion en présence de 0,5 mM de cystéine dans les HUVEC provenant de nouveau-nés à terme.

### 3.3 Incorporation de cystéine

Dans cette partie de l'étude, les cellules ont été traitées avec de la cystéine radioactive avec ou sans traitement préalable avec le BSO, ce dernier abaissant la concentration intracellulaire en glutathion par inhibition de la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase. Cette expérimentation tentait de mesurer l'utilisation de la cystéine pouvant être dirigée vers la synthèse du GSH ou vers la synthèse protéique (en présence de BSO dans ce dernier cas).

Sur des données préliminaires ( $n = 24$ ), la diminution de la concentration en glutathion est significative en présence de BSO,  $19,1 \pm 4,0$  vs  $32,0 \pm 4,2$  nmoles/mg (BSO vs contrôle),  $F_{(0,95; 1,22)} = 4,958$ ,  $p = 0,037$ , et le genre n'a pas d'effet sur cette diminution ( $F_{(0,95; 1,22)} = 0,951$ ,  $p = 0,340$ ). Le tableau IV à la page suivante indique la quantité de cystéine retrouvée dans le surnageant (où se retrouve le glutathion) et dans le culot de protéines du lysat cellulaire détectée par analyse de radioactivité. Les données sont comparées par analyse de variance à deux facteurs (fraction cellulaire et temps de culture). L'ANOVA ne détecte pas de différence entre les deux temps de culture choisis *a priori* ( $d = 6$  et  $d = 8$ ). Pour le traitement des cellules avec CYS 0,5 mM, une différence est décelée entre le culot et le surnageant, ce dernier en ayant en quantité supérieure. Tandis que pour le traitement BSO 1,0 mM + CYS 0,5 mM, il n'y a pas de différence entre les temps de culture d'une part et entre les deux fractions cellulaires d'autre part.

Tableau IV. Vitesse d'incorporation de cystéine selon les fractions cellulaires

TRAITEMENT	Fraction cellulaire	Cystéine (pmoles/ $\mu$ g protéines/4 heures)	
		Jour 6	Jour 8
CYS 0,5 mM (n = 4)	Surnageant	27,4 $\pm$ 6,6	30,5 $\pm$ 3,8
	Culot	5,2 $\pm$ 1,6	5,0 $\pm$ 0,9
BSO 1,0 mM + CYS 0,5 mM (n = 4)	Surnageant	16,0 $\pm$ 9,6	11,0 $\pm$ 1,1
	Culot	5,2 $\pm$ 2,8	3,0 $\pm$ 0,7

}] \*\*

\*\* p < 0,01

Enfin, pour l'ensemble des données de l'effet de la cystéine sur la concentration intracellulaire en glutathion et l'analyse de son incorporation cellulaire, les traitements semblaient avoir un effet sur la quantité de protéines. Les données sont rapportées au tableau V à la page suivante. En comparant les quatre traitements (contrôle (M199), BSO, CYS et BSO+CYS), on remarque que le BSO conjugué à l'apport de cystéine a un effet négatif sur la quantité de protéines. L'analyse statistique (ANOVA pour des échantillons inégaux) a été effectuée sur les données transformées ( $Y' = 1/Y$ ; Y représentant les données brutes) afin de rendre les variances sur les données brutes homogènes. L'analyse indique une différence significative dans la quantité de protéine entre les traitements,  $F_{(0,95; 3,36)} = 6,223$ ,  $p = 0,002$ . Il n'y a pas de différence entre les deux genres. Les tests *post hoc* (procédure

de Bonferroni) révèlent que la quantité de protéine est significativement plus basse lors du traitement avec BSO suivi de cystéine (BSO + CYS),  $p < 0,01$ .

Tableau V. Quantité de protéines (mg/puits) selon les traitements

	TRAITEMENTS			
	M199	BSO	CYS	BSO+CYS
Filles (n)	45,4 ± 9,4 (7)	42,3 ± 8,6 (6)	24,4 ± 1,2 (3)	21,4 ± 4,4 (2)
Garçons (n)	48,2 ± 7,7 (8)	35,8 ± 6,8 (6)	38,8 ± 4,9 (7)	18,2 ± 2,2 (5)
Total (n)	46,9 ± 5,8 (15)	39,0 ± 5,3 (12)	34,5 ± 4,0 (10)	19,1 ± 1,9** (7)

\*\* $p < 0,01$

En résumé, les données présentées indiquent une différence dans la prolifération cellulaire chez les HUVEC en culture entre les filles et garçons. Cette différence pourrait avoir un effet sur la croissance cellulaire et par conséquent sur certains mécanismes cellulaires dont la synthèse protéique (Hasegawa, 1988). Une division cellulaire plus importante, comme dans le cas des cellules de garçons, pourrait favoriser l'utilisation de la cystéine endogène ou exogène pour la synthèse protéique au détriment de la synthèse de glutathion (Townsend, 2003). L'apport de cystéine a donc été mesuré sur la concentration intracellulaire du glutathion ainsi que sur son

incorporation dans le surnageant du lysat cellulaire, où se retrouve le GSH, et le culot de protéines.

En ce qui concerne la concentration basale en glutathion, il n'y a pas de différence entre les cultures provenant de garçons et celles provenant de filles. Cependant, en présence de cystéine, les cultures de filles ont tendance à avoir une concentration en glutathion plus élevée que celles des garçons mais cette tendance devrait être confirmée par un plus grand nombre de cultures.

Pour les données portant sur l'incorporation de cystéine radioactive, le traitement BSO + CYS n'indique pas de différence significative de la présence de cystéine entre le culot et le surnageant contrairement au traitement avec cystéine seulement, où l'incorporation est plus importante dans le surnageant cellulaire. Ceci indique que l'utilisation de la cystéine n'est pas dirigée vers la synthèse du glutathion lorsque la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase est bloquée par le BSO sans qu'elle ne soit pour autant redirigée vers la synthèse protéique (culot).

Finalement, les données sur les protéines nous indiquent que le BSO n'est peut-être pas le meilleur modèle à utiliser pour bloquer la synthèse de GSH dans les HUVEC en culture. Le BSO, de même que la cystéine dans le milieu de culture, ont un effet négatif, mais non significatif, sur la quantité de protéine. Cependant, l'effet négatif est potentialisé par la présence subséquente de BSO et de cystéine et la diminution de la quantité de protéine est significativement différente de la situation contrôle.

#### 4. DISCUSSION

Les résultats obtenus sur l'évaluation de la prolifération des cellules en culture apportent de nouveaux éléments de différence entre les genres à l'échelle cellulaire (figure 4, pages 38 et tableau III, page 43). Pour les HUVEC provenant de garçons, la vitesse de prolifération est plus rapide, le plateau supérieur de la courbe de prolifération est plus élevé et le début du déclin de l'incorporation de thymidine, identifié comme un moment de sous-confluence, se produirait plus tard (12<sup>e</sup> jour de culture, par extrapolation selon la courbe de régression quadratique établie à partir des données). Pour les HUVEC provenant de filles le déclin se produit au jour 4. Cette sous-confluence est statistiquement différente entre les deux types de culture. L'activité mitotique chez les cellules provenant de garçons s'avère donc plus importante et le degré de confluence de ces cultures cellulaires n'est pas le même que celui des cultures provenant de filles.

Pourtant, on rapporte dans la littérature qu'après 7 jours en culture, les HUVEC forment une monocouche confluyente sur le support de culture (Gimbrone, 1974). Cependant, aucune différence au niveau de la prolifération cellulaire entre les genres n'avait été rapportée jusqu'à maintenant. Il serait important de vérifier le comportement des divisions cellulaires sur une plus longue période (au minimum deux semaines) pour s'assurer que les données sur les cellules provenant de nouveau-nés mâles correspondent à la fonction logistique ajustée aux présentes données.

Toutefois, il faut remarquer que l'on observe après 24 heures de culture une quantité plus importante d'ADN dans les cultures provenant de garçons mais sans qu'elle ne soit statistiquement différente de celles issues de filles. Cette différence pourrait



influencer les résultats quoique dans ce cas, l'espace disponible à la division cellulaire étant relativement moindre, l'incorporation de thymidine aurait eu tendance à ralentir plus tôt. Cette différence peut être due au fait que le premier passage sur lequel était effectué les expérimentations se faisait à partir d'une division des puits de cellules des cultures primaires sans comptage exact des cellules (un puits évalué à plus de 80 % de confluence était divisé en quatre pour la culture de premier passage). Il se peut aussi que l'activité mitotique soit dès le premier jour de culture plus importante dans les cultures cellulaires provenant de garçons. Pour éliminer cette ambiguïté dans l'interprétation des résultats, il s'avérerait important d'avoir un comptage exact des cellules au moment de la préparation des cultures en vue de l'expérimentation.

Hasegawa (1988) a déjà remarqué chez les HUVEC que plus les cultures étaient vieillissantes (passage de plus en plus nombreux), plus leur densité était faible pour un même temps de culture, c'est-à-dire que le nombre de cellules par unité de surface de culture diminuait avec le nombre de passage. Cette diminution serait principalement due à une perte de la capacité des cellules à se diviser. Dans cette même étude, la production de prostaglandine ( $\text{PGI}_2$ ), une des fonctions importantes des cellules endothéliales vasculaires, et la charge négative à la surface des cellules (protection qui maintient les cellules sanguines à distance du lit vasculaire) ont été évaluées dans les cultures vieillissantes; plus les passages étaient nombreux, moins grande était la production de  $\text{PGI}_2$  et la charge négative des cellules diminuait. La diminution dans la production de  $\text{PGI}_2$  a aussi été observée dans des cultures de

deuxième passage comparées à des cellules fraîchement isolées (Ranta, 1997). Ces données correspondent bien aux observations *in vivo* sur des tissus vasculaires (cellules endothéliales) qui démontrent les mêmes caractéristiques de vieillissement (Hasegawa, 1988). Si l'on se base sur ces indices (densité, production de PGI<sub>2</sub>, charge négative des cellules), il semblerait donc que plus les cellules ont subi un nombre grandissant de divisions cellulaires, plus elles sont âgées et vieillissantes.

D'autre part, Batres (1986) a observé que la synthèse de PGI<sub>2</sub> dans les HUVEC était différente selon que les cellules provenaient de cordon de garçons ou de filles, ces dernières en produisant en moins grande quantité. Si l'on fait un parallèle entre cette étude et les précédentes, les cellules provenant de filles apparaissent donc plus âgées parce que moins enclines à produire des prostaglandines. Les résultats sur la prolifération cellulaire dans la présente étude pourraient appuyer cette conjecture étant donné que l'activité mitotique des cellules de garçons est plus importante, ce qui indiquerait qu'elles sont à un état moins vieillissant (au temps 0, au moment de l'accouchement) que celles des filles. De plus, cette différence dans l'activité mitotique pourrait avoir des conséquences sur la croissance cellulaire en favorisant la synthèse protéique qui pourrait à son tour influencer les mécanismes de synthèse du glutathion (Hasegawa, 1988; Townsend, 2003). Il serait intéressant éventuellement de confirmer par d'autres indices portant sur la maturité cellulaire s'il existe une différence entre les cellules de filles et celles de garçons dans des cultures primaires de HUVEC.

L'hypothèse principale du travail de recherche voulant qu'un apport de cystéine dans le milieu de culture augmente la concentration intracellulaire de glutathion de façon substantielle n'a pas été vérifiée. Cependant, une tendance a été remarquée pour les cellules provenant de filles, où la concentration en glutathion était de 45,79 nmoles/mg de protéine versus 30,30 nmoles/mg de protéine pour les garçons (figure 7, page 44). Toutefois, le nombre d'échantillons étant faible pour les cultures cellulaires issues de filles, il faudrait une quinzaine d'échantillons provenant de chacun des genres (pour une erreur  $\alpha = 0,05$  et une erreur  $\beta = 0,1$ ) afin de confirmer ou infirmer cette tendance en considérant une même différence dans la concentration intracellulaire en glutathion.

L'effet de la cystéine (apport direct ou indirect) sur le glutathion intracellulaire a déjà été démontré dans certains modèles cellulaires. Par exemple, Deneke (1989) a étudié l'effet de 0,1 mM de cystéine ajouté au milieu de culture dans un modèle de cellules endothéliales de l'artère pulmonaire bovine. La concentration de GSH intracellulaire a été augmenté de 25 % après 2 heures d'incubation. D'autre part, une étude réalisée par Lavoie (2002) sur des cellules obtenues à partir d'aspirats trachéaux chez des nouveau-nés démontrait une corrélation positive entre la quantité de cystéine transportée dans les cellules et la concentration intracellulaire en glutathion. Cette corrélation n'était cependant présente que chez les cellules provenant de filles. Aussi, le transport de cystéine était plus important dans les leucocytes de sang de cordons ombilicaux pour une naissance à terme comparée à une naissance prématurée chez les filles. Chez les garçons nés à terme, le transport de cystéine demeurait au même

niveau que chez les prématurés. Ces données suggèrent possiblement une maturité moins avancée chez les garçons à la naissance et rejoindraient les données présentées sur la prolifération cellulaire.

Cependant, les résultats obtenus ici sur la concentration intracellulaire en glutathion en présence de cystéine ne corroborent pas ces données. Il se peut que les HUVEC en culture de premier passage utilisées dans la présente étude se comportent différemment des cellules *in situ* ou fraîchement isolées puisque Lavoie (1997) avait déjà démontré une différence entre les genres concernant la stimulation de la glutathion réductase dans ce même type de cellules. Par ailleurs, des études comparatives sur les cellules du cordon ombilical ont mis en évidence des différences moléculaires selon l'environnement de culture ou selon la lignée cellulaire dont elles étaient issues (de Assis, 2002; Dichek, 1989; Muller, 1999). Aussi, les cellules provenant des aspirats trachéaux et du sang de cordons ombilicaux sont en majorité des leucocytes. Ces cellules ont principalement une fonction de défense et l'activité du système du glutathion peut différer de celle des cellules endothéliales.

Toutefois, la cystéine est un acide aminé particulier reconnu pour avoir un effet cytotoxique *in vitro* et *in vivo*, même à des concentrations relativement faibles (Anderson, 1987; Nishiuch, 1976). Sur des données préliminaires pour la présente étude, le temps d'incubation des HUVEC avec le milieu additionné de cystéine-HCl à 0,5 mM avait un effet sur la concentration en glutathion. À des temps d'incubation de 2 ou 4 heures, la concentration augmentait ou restait au même niveau, tandis

qu'après 6 ou 8 heures d'incubation, la concentration diminuait par rapport au contrôle sans cystéine. De plus, le traitement avec cystéine diminuait la quantité de protéines présentes et cette diminution était significative par rapport au contrôle lorsque ce même traitement faisait suite au traitement avec BSO (tableau V, page 47). Cette diminution de la quantité de protéines en présence de cystéine pourrait être un indice d'un effet cytotoxique de cet acide aminé. L'intégrité membranaire des cellules pourrait être évaluée à diverses concentrations de cystéine dans le milieu de culture en mesurant la libération de lactate déshydrogénase dans le milieu ou encore en comparant la viabilité des cellules par prolifération cellulaire en présence ou non de cystéine (Cook, 1989).

Les mécanismes de toxicité de la cystéine ne sont pas bien établis mais ils sont déjà présents dans le milieu extracellulaire puisqu'il y a production de peroxyde lorsque la cystéine est oxydée en cystine. Les molécules de cystéine semblent aussi inhiber certaines enzymes en se fixant sur les groupes thiols des protéines essentielles (Anderson, 1987). Des études récentes sur la toxicité des antioxydants rendent compte de l'effet pro-oxydant de la cystéine sur l'intégrité cellulaire et du rôle qu'elle joue dans la peroxydation des lipides (Sato, 1997; Zager, 1998). La concentration de cystéine utilisée ici (0,5 mM) a été établie en fonction de son  $K_m$  pour l'activité de l'enzyme de synthèse  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase (première étape de la synthèse du glutathion). Cette concentration pourrait être diminuée et optimisée en tenant compte de son effet sur la concentration intracellulaire en glutathion tout en évitant une certaine toxicité aux cellules.

D'ailleurs, Cotgreave (1991) a déjà démontré que la présence de cystéine dans le milieu de culture à de faibles concentrations (5-25  $\mu\text{M}$ ) n'augmentait pas le glutathion intracellulaire de façon significative dans les HUVEC et qu'une concentration plus élevée était aussi moins efficace que la présence de cystine, cette dernière étant mieux transportée et augmentant par le fait même la concentration en cystéine intracellulaire.

Quant au BSO, il a été rapporté qu'il augmentait la sensibilité des cellules à la lyse en présence de peroxydes extracellulaires (Harlan, 1984). De plus, une étude de Ghibelli (1999) étudiant les effets cellulaires de l'inhibition de la synthèse du glutathion par le BSO, démontre que le cytochrome c mitochondrial se retrouve dans le cytosol après le traitement avec BSO. Quoique leur étude ne démontre pas de relation entre l'apoptose et la déplétion de GSH par le BSO, les auteurs précisent que la présence de cytochrome c dans le cytosol indique le début de la mort cellulaire et que la baisse de la concentration en glutathion intracellulaire pourrait être un signal induisant l'apoptose. Pour appuyer cette hypothèse, une étude portant sur l'apoptose des neutrophiles (Watson, 1999) démontre qu'une augmentation de GSH inhibe l'activité de la caspase 8, enzyme protéolytique impliquée dans la mort cellulaire, et stabilise ainsi la membrane mitochondriale. Aussi, des résultats sur la diminution de glutathion intracellulaire par le BSO dans une lignée cellulaire de lymphome B démontrent qu'une baisse en GSH peut activer la cascade apoptotique (Armstrong, 2002). Il semble donc que l'intégrité de la cellule soit fortement affectée par une baisse en glutathion sous l'action du BSO.

Finalement, les résultats sur l'utilisation intracellulaire de la cystéine indiquent que la cystéine a plus tendance à se retrouver dans le surnageant (fraction où l'on retrouve le GSH) que dans le culot de protéines pour les temps de culture  $d = 6$  et  $d = 8$  (tableau IV, page 46). Lorsque les cellules sont traitées d'abord avec le BSO, on remarque une baisse de la quantité de cystéine dans le surnageant. Toutefois, il n'y a pas de hausse de la concentration en cystéine au niveau du culot; la cystéine ne semble donc pas être redirigée vers la synthèse protéique lorsque l'on inhibe la néosynthèse de glutathion. On remarque cependant que la quantité totale de cystéine retrouvée dans le surnageant et le culot est moindre lorsque les cellules sont traitées avec le BSO. Il se peut que cette différence soit due à la sensibilité accrue des cellules en présence de BSO et que, lors de la récolte, la quantité de cellules ait été moindre que celle où les cellules étaient traitées avec de la cystéine seulement.

De plus, les temps de culture étudiés ne permettent pas de distinguer l'utilisation de la cystéine à différents degrés de prolifération puisqu'il n'y a pas de différence dans le transport de cystéine entre le jour 6 et le jour 8 pour une même fraction cellulaire. Ces deux temps de culture avaient été déterminés *a priori* et ne sont peut être pas suffisamment éloignés l'un de l'autre ou significatifs de la phase de croissance logarithmique et de sous-confluence respectivement.

Néanmoins, la cystéine reste un élément intéressant à étudier pour l'optimisation de la quantité de glutathion intracellulaire chez les nouveau-nés, en particulier chez les prématurés. La cystéine est un acide aminé conditionnellement essentiel chez les nouveau-nés puisque la cystathionase (enzyme qui transforme la méthionine en

cystéine) n'est pas mature avant une à deux semaines de vie et que des bas niveaux en glutathion sont souvent associés au développement de certaines pathologies (Lavoie, 1997; Németh, 1994; Papp, 1999; Vina, 1995; Zlotkin, 1982).

Dans le même ordre d'idée, l'apport supplémentaire de cystéine via une solution parentérale a été étudiée dans un modèle de prématurité chez des babouins. L'ajout de cystéine n'a pas augmenté la concentration en glutathion dans le plasma, toutefois, un apport de glutathion dans les solutions parentérales a haussé les niveaux de cystéine plasmatique probablement par catabolisme de GSH. Ces données présument que le glutathion pourrait être une source de cystéine en plus d'être utilisée comme molécule antioxydante, ce qui expliquerait les faibles concentrations en glutathion observées *in vivo* chez les nourrissons soumis à des stress oxydants incluant la prématurité (Stabler, 2000).

Concernant la présente étude, la tendance qu'a la cystéine à augmenter la concentration intracellulaire en glutathion, particulièrement chez les cellules provenant de filles, pourrait être confirmée par plus de données. Cependant, l'effet cytotoxique de la cystéine, qui semble potentialisé par le BSO, pourrait être étudié plus à fond et appuyer la tendance actuelle à utiliser des précurseurs de cystéine plutôt que l'acide aminé lui-même. Le N-acétylcystéine (NAC) et l'acide L-2-oxothiazolidine-4-carboxylique (OTC) augmentent le glutathion par apport indirect de cystéine. La déacétylation du NAC produit de la cystéine et l'OTC, un analogue de la 5-oxoproline, est converti en S-carboxy-L-cystéine par la 5-oxoprolinase et se scinde spontanément en L-cystéine (Anderson, 1998). Il a été démontré, dans un



modèle de cellules endothéliales de l'artère pulmonaire, que le NAC accroissait le glutathion par une plus grande disponibilité intracellulaire de cystéine (Deneke, 1983; Phelps, 1989). De son côté, l'OTC augmente de façon significative le glutathion intracellulaire dans les cellules endothéliales ainsi que le glutathion hépatique dans un modèle de rat (Tsan, 1985).

Il serait de conséquence d'étudier l'effet de ces précurseurs de cystéine sur la concentration intracellulaire en glutathion dans un modèle de HUVEC provenant de nouveau-nés à terme et prématurés puisque ce type de cellules semblent refléter le degré de maturité des nouveau-nés. Une augmentation de la concentration en glutathion ou une meilleure utilisation de celui-ci par un apport supplémentaire de cystéine ou un de ses précurseurs pourrait être bénéfique pour les nouveau-nés soumis à des stress oxydants. Cependant, ces deux composés précurseurs de cystéine peuvent avoir des effets délétères en augmentant la concentration de thiols libres dans l'organisme et leur mode d'action respectif peuvent être différents selon les pathologies ou les situations cliniques (Deneke, 2000; Domenighetti, 1999).

En conclusion, le modèle cellulaire utilisé a apporté des données nouvelles sur la prolifération cellulaire en mettant en évidence une différence entre les cellules de filles et de garçons. Les résultats obtenus pourraient être un indice sur la maturation intra-utérine des fœtus, qui serait plus avancée chez les filles, et possiblement expliquer les différences en ce qui concerne la défense antioxydante ou autres systèmes cellulaires chez les nouveau-nés puisque les garçons semblent défavorisés par rapport aux filles.

Les données sur la prolifération cellulaire pourraient être confirmées par des analyses d'ADN en cytométrie de flux et par des analyses immunohistochimiques déterminant l'activité mitotique ou encore en mesurant différentes activités métaboliques (Cook, 1989; Hall, 1990).

Cette étude pourrait être complétée par l'évaluation de la maturation des systèmes de défense antioxydante selon le type d'accouchement. En effet, les études épidémiologiques démontrent clairement que les accouchements par césarienne sont plus fortement reliés à une morbidité respiratoire du nouveau-né (Annibale, 1995; Hales, 1993; Hook, 1997; Morrison, 1995). Un modèle *in vitro* ou *in situ* de HUVEC pourrait être utilisé pour comparer l'état du système du glutathion selon le type d'accouchement. Aussi, un modèle animal reproduisant des conditions menant à une morbidité respiratoire tel que celui proposé par Arbibe (1997) pourrait être utile afin de démontrer une différence dans le métabolisme cellulaire concernant la défense antioxydante.

De même, il serait intéressant de vérifier l'effet du lait maternel sur les systèmes de défense antioxydante puisque celui-ci augmente la capacité antioxydante des nourrissons exclusivement nourris au sein (Ostrea, 1986; van Zoeren-Grobbe, 1994; Wispe, 1985). Un modèle cellulaire étudiant les systèmes de défense antioxydante en présence de lait maternel pourrait être élaboré, à l'instar d'autres études qui ont étudié l'effet du lait maternel sur certaines fonctions cellulaires (Buescher, 1988; Grazioso, 1996).

## BIBLIOGRAPHIE

Allen, K.G.D. and J.R. Arthur, 1987. Inhibition by 5-sulphosalicylic acid of the glutathione reductase recycling assay for glutathione analysis. *Clinica Chimica Acta* 162 : 237-239

Anderson, M.E. 1998. Glutathione : an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biol Interact* 111-112 : 1-14

Anderson, M.E. and A. Meister, 1987. Intracellular delivery of cysteine. *Methods Enzymol* 143 : 313-325

Annibale, D.J., T.C. Hulsey, C.L. Wagner, and W.M. Southgate, 1995. Comparative neonatal morbidity of abdominal and vaginal deliveries after uncomplicated pregnancies. *Arch Pediatr Adolesc Med* 149 : 862-867

Arbibe, L., D. Vial, I. Rosinski-Chupin, N. Havet, M. Huerre. B.B. Vargaftig, and L. Touqui, 1997. Endotoxin induces expression of type II phospholipase A2 in macrophages during acute lung injury in guinea pigs: involvement of TNF-alpha in lipopolysaccharide-induced type II phospholipase A2 synthesis. *J Immunol* 159(1) : 391-400

Armstrong, J.S., K.K. Steinauer, B. Hornung, J.M. Irish, P. Lecane, G.W. Birrell, D.M. Peehl, and S.J. Knox, 2002. Role of glutathione depletion and reactive oxygen

species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death Differ* 9(3) : 252-263

Asikainen, T.M., K.O. Raivio, M. Saksela, and V. L. Kinnula, 1998. Expression and development profile of antioxidant enzymes in human lung and liver. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19 : 942-949

Bates, D.M. and D.G Watts. *Nonlinear regression analysis and its application*. New York : John Wiley & Sons, 1988

Batres, R.O. and J. Dupont, 1986. Gender differences in prostacyclin and prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis by human endothelial cells. *Prostaglandins Leukotrienes Med* 22 : 159-171

Benaron, D.A. and F.W. Bowen, 1991. Variation of initial serum bilirubin rise in newborn infants with type of illness. *Lancet* 338 : 78-81

Bracci, R. 1997. Free oxygen radicals and surfactant. *Biol Neonate* 71(suppl 1) : 23-27

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 : 248-254

Bray, T.M. and C.G. Taylor, 1994. Enhancement of tissue glutathione for antioxidant and immune functions in malnutrition. *Biochem Pharmacol* 47(12) : 2113-2123

Buescher, E.S. and S.M. McIlheran, 1988. Antioxidant properties of human colostrum. *Ped Res* 24(1) : 14-19

Buescher, E.S. and S.M. McIlheran, 1992. Colostral antioxidants : Separation and characterization of two activities in human colostrum. *J Ped Gastroentero Nut* 14(1) : 47-56

Byrne, B.J., B.G. Mellen, D.P. Lindstrom and R.B. Cotton, 2002. Is the BPD epidemic diminishing? *Seminars Perinat* 26(6) : 461-466

Chessex, P., J.C. Lavoie, S. Laborie and J. Vallée, 1999. Survival of guinea pig pups in hyperoxia is improved by enhanced nutritional substrate availability for glutathione production. *Pediatr Res* 46(3) : 305-310

Cole, C.H. and J.M. Fiascone, 2000. Strategies for prevention of neonatal chronic lung disease. *Seminars Perinat* 24(6) : 445-462

Cook, J.A. and J.B. Mitchell, 1989. Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal Biochem* 179 : 1-7

Corcoran, J.D., C.C. Patterson, P.S. Thomas and H.L. Halliday, 1993. Reduction in the risk of bronchopulmonary dysplasia from 1980-1990: results of a multivariate logistic regression analysis. *Eur J Pediatr* 152 : 677-681

Cotgreave, I.A., D. Constantin and P. Moldéus, 1991. Nonxenobiotic manipulation and sulfur precursor specificity of human endothelial cell glutathione. *J Appl Physiol* 70 : 1220-1227

de Assis, M.C., M.C. Plotkowski, I.M. Fierro, C. Barja-Fidalgo and M.S. de Freitas, 2002. Expression of inducible nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells during primary culture. *Nitric Oxide* 7(4) : 254-261

Deneke, S.M., S.N. Gershoff, and B.L. Fanburg, 1983. Potentiation of oxygen toxicity in rats by dietary protein or amino acid deficiency. *J Appl Physiol* 54 : 147-151

Deneke, S.M. and B.L. Fanburg, 1989. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol* 257 : L163-L173

Deneke, S.M., 2000. Thiol-based antioxidants. *Curr Top Cell Regul* 36 : 151-180

Dennery, P.A., A.F. McDonagh, D.R. Spitz, P.A. Rodgers, and D.K. Stevenson, 1995. Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia. *Free Rad Biol Med* 19(4) : 395-404

Dichek, D. and T. Quertermous, 1989. Variability in messenger RNA levels in human umbilical vein endothelial cells of different lineage and time in culture. In *Vitro Cell Dev Biol* 25 : 289-292

Dodge, M.L., R.C. Wander, Y. Xia, J.A. Butler, and P.D. Whanger, 1998. Glutathione peroxidase activity modulates fatty acid profiles of plasma and breast milk in chinese women. *J Trace Elements Med Biol* 12 : 221-230

Domenighetti G., C. Quattropiani, and M.D. Schaller, 1999. SYNTHÈSE Utilisation thérapeutique de la N-Acétylcystéine au cours des agressions pulmonaires aiguës. *Rev Mal Respir* 16(1) : 29-37

Downs, T.R. and W.W. Wilfinger, 1983. Fluorometric quantification of DNA in cells and tissue. *Anal Biochem* 131 : 538-547

Ellis, L., M.F. Picciano, A.M. Smith, M. Hamosh, and N.R. Mehta, 1990. The impact of gestational length on human milk selenium concentration and glutathione peroxidase activity. *Ped Res* 27(1) : 32-35

Fenton, B.W., C.-S. Lin, S. Archer, and C. Macedonia, 2000. Magnetic resonance spectroscopy to detect lecithin in amniotic fluid and fetal lung. *Obstet Gynecol* 95(3) : 457-460

Field, N.T. and W.M. Gilbert, 1997. Current status of amniotic fluid tests of fetal maturity. *Clin Obstet Gynecol* 40(2) : 366-386

Frank L. and E.E. Groseclose, 1984. Preparation for birth in an O<sub>2</sub>-rich environment: the antioxidant enzymes in the developing rat lung. *Pediatr Res* 18(3) : 240-244

Freeman, B.A. and J.D. Crapo, 1982. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47(5) : 412-426

Garofalo, R.P. and A.S. Goldman, 1999. Expression of functional immunomodulatory and anti-inflammatory factors in human milk. *Clinics in Perinatol* 26(2) : 361-377

Ghibelli, L., S. Coppola, C. Fanelli, G. Rotilio, P. Civitareale, A.I. Scovassi, and M.R. Ciriolo, 1999. Glutathione depletion causes cytochrome c release even in the absence of cell commitment to apoptosis. *FASEB J* 13(14) : 2031-2036

Gimbrone, M.A., R.S. Cotran, and J. Folkman, 1974. Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis. *J Cell Biol* 60 : 673-684

Gluck, L., M.V. Kulovich, R.C. Borer, P.H. Brenner, G.G. Anderson, and W.N. Spellacy, 1971. Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol* 109 : 440-445



Goddart-Finegold, J., E.M. Mizrahi, and R.T. Lee, 1998. The newborn nervous system. In *Avery's diseases of the newborn*, 7<sup>th</sup> ed., Taeusch and Ballard, eds. WB Saunders, Philadelphia, pp. 859-871

Gowen, C.W., E.E. Lawson, J. Gingras, R.C. Boucher, J.T. Gatzky, and M.R. Knowles, 1988. Electrical potential difference and ion transport across nasal epithelium of term neonates: Correlation with mode of delivery, transient tachypnea of the newborn, and respiratory rate. *J Pediatr* 113 : 121-127

Grazioso, C.F. and E.S. Buescher, 1996. Inhibition of neutrophil function by human milk. *Cellular Immunol* 168 : 125-132

Griffith, O.W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106 : 207-212

Griffith, O.W. and A. Meister, 1979. Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butylhomocysteine sulfoximine). *J Biol Chem* 254 : 7558-7560

Hales, K.A., M.A. Morgan, and G.R. Thurnau, 1993. Influence of labor and route of delivery on the frequency of respiratory morbidity in term neonates. *Int J Gynecol Obstet* 43 : 35-40

Hall, P.A. and D.A. Levison, 1990. Review : Assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol* 43 : 184-192

Harlan, J.M., J.D. Levine, K.S. Callahan, B.R. Schwartz, and L.A. Harker, 1984. Glutathione redox cycle protects cultured endothelial cells against lysis by extracellularly generated hydrogen peroxide. *J Clin Invest* 73 : 706-713

Hasegawa, N., M. Yamamoto, T. Imamura, Y. Mitsui, and K. Yamamoto, 1988. Evaluation of long-term cultured endothelial cells as a model system for studying vascular ageing. *Mechanisms Ageing Develop* 46 : 111-123

Hook, B., R. Kiwi, S.B. Amini, A. Fanaroff, and M. Hack, 1997. Neonatal morbidity after elective repeat cesarean section and trial of labor. *Pediatrics* 100(3) : 348-353

Israel, E.J. 1994. Neonatal necrotizing enterocolitis, a disease of the immature intestinal mucosal barrier. *Acta Pædiatr Suppl* 396 : 27-32

Jaffe, E.A., R.L. Nachman, C.G. Becker, and C.R. Minick, 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical vein. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52 : 2745-2756

Jain, A., T. Mehta, P.A. Auld, J. Rodrigues, R.F. Ward, M.K. Schwartz, and J. Mårtensson, 1995. Glutathione metabolism in newborns : evidence for glutathione

deficiency in plasma, bronchoalveolar lavage fluid, and lymphocytes in prematures. *Pediatr Pulmonol* 20(3) : 160-166

Jain, L. 1999. Alveolar fluid clearance in developing lungs and its role in neonatal transition. *Clinics Perinatol* 26(3) : 585-599

Jonas, H.A. and J.M. Lumley, 1997. The effect of mode of delivery on neonatal mortality in very low birthweight infants born in Victoria, Australia: Caesarean section is associated with increased survival in breech-presenting, but not vertex-presenting, infants. *Pæd Peri Epidemio* 11 : 181-199

Kaplan, M., M. Muraca, C. Hammerman, M.T. Vilei, C. Leiter, B. Rudensky, and F.F. Rubaltelli, 1998. Bilirubin conjugation, reflected by conjugated bilirubin fractions, in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient neonates : a determining factor in the pathogenesis of hyperbilirubinemia. *Pediatrics* 102(3) : E37

Knapen, M.F.C.M., P.L.M. Zusterzeel, W.H.M. Peters, and E.A.P. Steegers, 1999. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. A review. *European J Obst Gynecol Reprod Biol* 82 : 171-184

Lavoie, J.C. and P. Chessex, 1997. Gender and maturation affect glutathione status in human neonatal tissues. *Free Rad Biol Med* 23(4) : 648-657

Lavoie, J.C. and P. Chessex, 1998. Development of glutathione synthesis and  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase activities in tissues from newborn infants. *Free Rad Biol Med* 24(6) : 994-1001

Lavoie, J.C., T. Rouleau, A.C. Truttmann, and P. Chessex, 2002. Postnatal gender-dependant maturation of cellular cysteine uptake. *Free Rad Res* 36(8) : 811-817

Leaf, C.D. and G.W. Pace, 1994. Development of a novel glutathione repleting agent, L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid (Procyteine<sup>®</sup>). *Exp Opin Invest Drugs* 3(12) : 1293-1302

Lie-Injo, L.E., W.P. Wan, and T. Ng, 1973. Reduced glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase, and pyruvate kinase in erythrocytes of human newborns and adults in Malaysia. *Br J Haematol* 25 : 577-584

Liu, K.-Z., R.A. Shaw, T.C. Dembinski, G.J. Reid, S.L. Ying, and H.H. Mantsch, 2000. Comparison of infrared spectroscopic and fluorescence depolarization assays for fetal lung maturity. *Am J Obstet Gynecol* 183(1) : 181-187

Malloy, M.H. and D.H. Freeman, 2000. Respiratory distress syndrome mortality in the United States, 1987 to 1995. *J Perinatol* 20 : 414-420

Matés, J.M., C. Pérez-Gómez and I. Núñez de Castro, 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32(8) : 595-603

Mårtensson, J., A. Jain, and A. Meister, 1990. Glutathione is required for intestinal function. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 1715-1719

McCord, J.M. 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 108 : 652-659

McDonagh, A.F. 1990. Is bilirubin good for you? *Clin Perinatol* 17(2) : 359-369

Meister, A. and M.E. Anderson, 1983. Glutathione. *Ann Rev Biochem* 52 : 711-760

Meister, A. 1991. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmac Ther* 51 : 155-194

Metsvaht, T., P. Ilves, T. Talvik, K. Zilmer, M. Zilmer, and R. Talvik, 1999. Possible oxidative stress in healthy term newborns. *Acta Pædiatr* 88 : 1299-1300

Miller, R.A. and B.E. Britigan, 1997. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev* 10(1) : 1-18

Mireles, L.C., M.A. Lum, and P.A. Dennery, 1999. Antioxidant and cytotoxic effects of bilirubin on neonatal erythrocytes. *Pediatr Res* 45(3) : 355-362

Moison, R.M.W., A.A. Haasnoot, D. van Zoeren-Grobbe, and H.M. Berger, 1997. Red blood glutathione and plasma sulfhydryls in chronic lung disease of the newborn. *Acta Pædiatr* 86 : 1363-1369

Morrison, J.J., J.M. Rennie, and P.J. Milton, 1995. Neonatal respiratory morbidity and mode of delivery at term: influence of timing of elective caesarean section. *Br J Obstet Gynæcol* 102 : 101-106

Muller, A.M., C. Cronen, K.M. Muller, and C.J. Kirkpatrick, 1999. Comparative analysis of the reactivity of human umbilical vein endothelial cells in organ and monolayer culture. *Pathobiol* 67(2) : 99-107

Naeye, R.L., L.S. Burt, D.L. Wright, W.A. Blanc, and D. Tatter, 1971. Neonatal mortality, the male disadvantage. *Pediatrics* 48(6) : 902-906

Narayan, H. and D.J. Taylor, 1994. The role of caesarean section in the delivery of the very preterm infant. *Br J Obstet Gynaecol* 101 : 936-938

Németh, I. and D. Boda, 1994. Blood glutathione redox ratio as a parameter of oxidative stress in premature infants with IRDS. *Free Radic Biol Med* 16 : 347-353

Neu, J. and M.D. Weiss, 1999. Necrotizing enterocolitis: Pathophysiology and prevention. *J Parenteral Enteral Nut* 23(5) : S13-S17

Neville, M.C., J. Morton, and S. Umemura, 2001. Lactogenesis: The transition from pregnancy to lactation. *Pediatr Clinics North Am* 48(1) : 35-52

Nishiuch, Y., M. Sasaki, M. Nakayasu, and A. Oikawa, 1976. Cytotoxicity of cysteine in culture media. *In Vitro* 12(9) : 635-638

Oshiro, M., S. Mimura, M. Hayakawa, and K. Watanabe, 2001. Plasma and erythrocyte levels of trace elements and related antioxidant enzyme activities in low-birthweight infants during the early postnatal period. *Acta Pædiatr* 90 (11) : 1283-1287

Ostrea, E.A., J.E. Balun, R. Winkler, and T. Porter, 1986. Influence of breast-feeding on the restoration of the low serum concentration of vitamin E and  $\beta$ -carotene in the newborn infant. *Am J Obstet Gynecol* 154 : 1014-1017

Papp, A., I. Németh, E. Karg, and E. Papp, 1999. Glutathion status in retinopathy of prematurity. *Free Rad Biol Med* 27 : 738-743

Pashankar, D. and R.A. Schreiber, 2000. Neonatal cholestasis : a red alert for the jaundiced newborn. *Can J Gastroenterol* 14 Suppl D : 67D-72D

Perelman, R.H., M. Palta, R. Kirby, and P.M. Farrell, 1986. Discordance between male and female deaths due to the respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 78(2) : 238-244

Phelps, D.T., S.M. Deneke, D.F. Baxter, and B.L. Fanburg, 1989. Erythrocytes fail to induce glutathione levels in response to diethyl maleate or hyperoxia. *Am J Physiol* 257 : L272-L276

Pruitt, K.M., F. Rahemtulla, B. Månsson-Rahemtulla, D.C. Baldone, and G.T. Laven, 1991. Peroxidases in human milk. *Adv Exp Med Biol* 310 : 137-144

Rahman, I. and W. MacNee, 2000. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J* 16 : 534-554

Ranta, V., A. Orpana, T. Mikkola, O. Ylikorkala, and L. Viinikka, 1997. Culturing of human vascular endothelial cells strongly affects their endothelin-1 and prostacyclin production. *Molecular Cellular Biochem* 177 : 251-255

Ripalda, M.J., N. Rudolph, and S.L. Wong, 1989. Developmental patterns of antioxidant defense mechanisms in human erythrocytes. *Ped Res* 26(4) : 366-369

Roberts, J.C. and D.J. Francetic, 1993. The importance of sample preparation and storage in glutathione analysis. *Anal Biochem* 211 : 183-187



Ross, M.G. and M.J.M. Nijland, 1998. Development and ingestive behavior. *Am J Physiol* 274 : R879-R893

Rubaltelli, F.F., L. Bonafè, M. Tangucci, A. Spagnolo, and C. Dani, 1998. Epidemiology of neonatal acute respiratory disorders. *Biol Neonate* 74 : 7-15

Satoh, K and H. Sakagami, 1997. Effect of cysteine, N-acetyl-L-cysteine and glutathione on cytotoxic activity of antioxidants. *Anticancer Res* 17(3C) : 2175-2179

Saugstad, O.D. 1990. Oxygen toxicity in the neonatal period. *Acta Pædiatr Scand* 79 : 881-892

Saugstad, O.D. 1998. Chronic lung disease : The role of oxidative stress. *Biol Neonate* 74(suppl 1) : 21-28

Schanler, R.J., R.J. Shulman, and C. Lau, 1999. Feeding strategies for premature infants: Beneficial outcome of feeding fortified human milk versus preterm formula. *Pediatrics* 103(6) : 1150-1157

Schwarz, K.B., J.M. Cox, S. Sharma, L. Clement, F. Witter, H. Abbey, S.S. Sehnert, and T.H. Risby, 1997. Prooxidant effects of maternal smoking and formula in newborn infants. *J Ped Gastroentero Nut* 24 : 68-74

Shah, U. and W.A. Walker, 2000. Adverse host responses to bacterial toxins in human infants. *J Nut* 130 (2S Suppl) : 420S-425S

Shan, X., T.Y. Aw, and D.P. Jones, 1990. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmac Ther* 47 : 61-71

Singhal, R.K. and A. Jain, 2000. Glutathione ethyl ester supplementation prevents mortality in newborn rats exposed to hyperoxia. *Biol Neonate* 77 : 261-266

Stabler, S.P., R.L. Morton, S.L. Winski, R.H. Allen, and C.W. White, 2000. Effects of parenteral cysteine and glutathione feeding in a baboon model of severe prematurity. *Am J Clin Nut* 72 : 1548-1557

Stadtman, E.R. 1991. Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins. *Am J Clin Nut* 54 : 1125S-1128S

Sullivan J.L. and R.B. Newton, 1988. Serum antioxidant activity in neonates. *Arch Dis Child* 63 : 748-750

Thibeault, D.W. 2000. The precarious antioxidant defenses of the preterm infant. *Am J Perinatol* 17(4) : 167-181

Thomas, S.R., J. Neuzil, D. Mohr, and R. Stocker, 1995. Coantioxidants make alpha-tocopherol an efficient antioxidant for low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr* 62 (6 Suppl) : 1357S-1364S

Townsend, D.M., K.D. Tew and H. Tapiero, 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* 57 : 145-155

Tsan, M.F., E.H. Danis, P.J. Del Vecchio, and C.L. Rosano, 1985. Enhancement of intracellular glutathione protects endothelial cells against oxidant damage. *Biochem Biophys Res Comm* 127(1) : 270-276

van der Vliet, A. and C.E. Cross, 2000. Oxidants, nitrosants, and the lung. *Am J Med* 109 : 398-421

van Zoeren-Grobbe, D., J.H.N. Lindeman, E. Houdkamp, R. Brand, J. Schrijver, and H.M. Berger, 1994. Postnatal changes in plasma chain-breaking antioxidants in healthy preterm infants fed formula and/or human milk. *Am J Clin Nutr* 60 : 900-906

Vina, J., M. Vento, F. Garcia-Sala, I.R. Puertes, E. Gasco, J. Sastre, M. Asensi, and F.V. Pallardo, 1995. L-Cysteine and glutathione metabolism are impaired in premature infants due to cystathionase deficiency. *Am J Clin Nutr* 61 : 1067-1069

Warshaw, J.B., C.W. 3<sup>rd</sup> Wilson, K. Saito and R.A. Prough, 1985. The responses of glutathione and antioxidant enzymes to hyperoxia in developing lung. *Pediatr Res* 19(8) : 819-823

Watson, R.W.G., A. O'Neill, A.E. Brannigen, R. Coffey, J.C. Marshall, H.R. Brady, and J.M. Fitzpatrick, 1999. Regulation of Fas antibody induced neutrophil apoptosis is both caspase and mitochondrial dependent. *FEBS Letters* 453 : 67-71

Wispe, J.R., E.F. Bell, and R.J. Roberts, 1985. Assessment of lipid peroxidation in newborn infants and rabbits by measurements of expired ethane and pentane : Influence of parenteral lipid infusion. *Ped Res* 19(4) : 374-379

Zager, R.A. and K.M. Burkhart, 1998. Differential effects of glutathione and cysteine on  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $H_2O_2$  and myoglobin-induced proximal tubular cell attack. *Kidney International* 53(6) : 1661-1672

Zhang, Z., D.R. Blake, C.R. Stevens, J.M. Kanczler, P.G. Winyard, M.C.R. Symons, M. Benboubetra, and R. Harrison, 1998. A reappraisal of xanthine dehydrogenase and oxidase in hypoxic reperfusion injury: the role of NADH as an electron donor. *Free Rad Res* 28 : 151-164

Zlotkin, S.H. and H. Anderson, 1982. The development of cystathionase activity during the first year of life. *Pediatr Res* 16 : 65-68