

Université de Montréal

La nutrition parentérale modifie le statut et le potentiel redox
du glutathion hépatique chez le modèle néonatal
du cochon d'Inde

Par

Cindy Gauthier

Programme de sciences biomédicales

11615559

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître Sciences (M.Sc.)
en sciences biomédicales

Novembre, 2004

© Cindy Gauthier, 2004



W

4

U58

2005

V.035

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 :

La nutrition parentérale modifie le statut et le potentiel redox
du glutathion hépatique chez le modèle néonatal
du cochon d'Inde

présenté par :

Cindy Gauthier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Guylaine Bouchard : Président-rapporteur

Dr Jean-Claude Lavoie : Directeur de recherche

Dre Christine Des Rosiers : Membre du jury

RÉSUMÉ

Introduction : Il est connu que la nutrition parentérale (NP) telle qu'administrée en clinique est contaminée de peroxydes et est associée à des complications hépatiques telles la cholestase et la stéatose. Les peroxydes générés dans la NP peuvent influencer le statut et potentiel redox du glutathion hépatique, qui est un système de défense contre les oxydants. Ainsi l'**hypothèse** du présent mémoire est que la nutrition parentérale influence le statut et potentiel redox du glutathion hépatique, et que la cholestase et la stéatose sont associées à une modification de ce statut et potentiel redox. **L'objectif principal** est de vérifier l'association entre la NP, le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique. Les **sous objectifs** sont :1) la validation de l'électrophorèse capillaire en solution libre (EC) et comparer celle-ci à une méthode enzymatique, et 2) l'expérimentation de 4 protocoles *in vivo* pour répondre à l'objectif principal et à l'hypothèse. **Méthodes :** Le modèle animal est le cochon d'Inde de 3 jours de vie, recevant des solutions intraveineuses constituées de composantes enrichies ou non de H₂O₂. Après 4 jours, les animaux sont sacrifiés, le sang et le foie sont prélevés. La détermination simultanée du glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG) est effectuée par EC. Les niveaux d'8-isoprostane F_{2α} sont quantifiés par ELISA. Le glutathion total est déterminé par EC et une méthode enzymatique. Les niveaux de peroxydes sont mesurés par la méthode colorimétrique de FOX. Les résultats sont analysés par ANOVA factorielle avec une limite fixée à p<0,05. **Résultats :** EC est comparable à la méthode enzymatique. H₂O₂ contenu dans la NP augmente le statut et potentiel redox du glutathion et les niveaux d'8-isoprotane F_{2α}. Lorsque la NP est composée d'acides aminés et de lipides, le statut et potentiel redox sont plus élevés, mais ils sont diminués quand la NP est exposée à la lumière. Il n'y a pas de lien entre la modification du statut redox et la cholestase ou la stéatose. **Conclusion :** L'électrophorèse capillaire est performante pour mesurer le GSH et GSSG afin de déterminer le statut et potentiel redox du glutathion. La NP modifie le statut et le potentiel redox du glutathion différemment au foie qu'au niveau du globule rouge. Les complications hépatiques associées à la NP, ne sont pas liées à une modification du statut redox du glutathion.

Mots clés : Nutrition parentérale, statut redox, potentiel redox, glutathion, peroxydes, stress oxydatif, cholestase, stéatose, cochon d'Inde, néonatal.

ABSTRACT

Introduction: It is known that parenteral nutrition (PN), as managed at the bed side, is contaminated by peroxides and is associated with hepatic complications such as cholestasis and steatosis. Peroxides generated in PN can influence the hepatic redox status and potential. Thus the **hypothesis** of the present report is that parenteral nutrition influences the hepatic glutathione redox status and potential, and that cholestasis and steatosis are associated with modification of redox status and potential. The **main objective** is to demonstrate the association between the PN and redox status and potential of glutathione. It includes are: 1) to validate the capillary zone electrophoresis (CE) and to compare it with the enzymatic method, 2) use of four *in vivo* protocols that will help answer the main objective. **Methods:** The animal model used is 3-day old guinea pigs, receiving intravenous solutions containing various components enriched or not with H_2O_2 . After 4 days of PN the animals are sacrificed, both blood and liver are collected. Reduced (GSH) and oxidized (GSSG) forms of glutathione are simultaneously measured by CE, 8-isoprostane $F_{2\alpha}$ levels are quantified by ELISA, total glutathione is also determined by the Griffith's enzymatic method. Peroxide levels present in NP solutions are measured by the FOX assay. The results are analyzed by factorial ANOVA with a limit fixed to $p < 0,05$. **Results:** CE is comparable to enzymatic method. The H_2O_2 present in PN solutions increase both the redox potential and the level of 8-isoprotane $F_{2\alpha}$. In the presence of amino acids and lipids, the redox status and potential are increased but are decreased by light exposure. There is no link between the modification of the redox status and cholestasis or steatosis. **Conclusion:** Capillary zone electrophoresis is a powerful method used to measure the GSH and GSSG levels in order to determine the glutathione redox status and potential. The effect of PN on redox status and potential is tissue specific. The redox status is not associated with cholestasis or hepatic steatosis.

Key words: Parenteral nutrition, redox status, redox potential, glutathione, peroxide, oxidative stress, cholestasis, steatosis, guinea pig, neonatal.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|------------------------------|------|
| PAGE DE PRÉSENTATION | i |
| IDENTIFICATION DU JURY | ii |
| RÉSUMÉ | iii |
| ABSTRACT | iv |
| TABLE DES MATIÈRES | v |
| LISTE DES FIGURES | vii |
| LISTE DES TABLEAUX..... | ix |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | x |
| REMERCIEMENTS | xii |
| AVANT-PROPOS | xiii |

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCTION | 1 |
| 1.1 NUTRITION PARENTÉRALE ASSOCIÉE À DES COMPLICATIONS HEPATIQUES | 2 |
| 1.1.1 <i>Nutrition parentérale</i> | 2 |
| 1.1.2 <i>Rôle du stress oxydant dans les complications hépatiques reliées à la nutrition parentérale</i> | 2 |
| 1.1.2.1 Cholestase | 3 |
| 1.1.2.2 Stéatose..... | 7 |
| 1.2 GÉNÉRATION DE PEROXYDE D'HYDROGÈNE DANS LA NUTRITION PARENTÉRALE ... | 11 |
| 1.3 OXYDANT ET ANTIOXYDANT | 15 |
| 1.3.1 <i>Oxydant</i> | 15 |
| 1.3.1.1 Peroxyde d'hydrogène..... | 16 |
| 1.3.2 <i>Antioxydant</i> | 17 |
| 1.3.2.1 Glutathion..... | 17 |
| 1.4 STRESS OXYDANT ET MARQUEURS D'IDENTIFICATION | 18 |
| 1.4.1 <i>Stress oxydant</i> | 18 |
| 1.4.1 <i>Peroxydation lipidique</i> | 19 |
| 1.4.1.1 Marqueurs de la peroxydation lipidique | 22 |
| 1.4.2 <i>Glutathion (L-γ-glutamyl-L-cystéinyglycine)</i> | 26 |
| 1.4.2.1 Métabolisme du glutathion..... | 28 |
| 1.4.2.2 Enzymes impliquées dans le cycle redox du glutathion | 30 |
| 1.4.2.3 Statut et potentiel redox..... | 32 |
| 1.5 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE TRAVAIL | 35 |
| 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES | 37 |
| 2.1 MATÉRIEL | 38 |
| 2.2 ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE | 39 |
| 2.2.1 <i>Préparation de l'échantillon</i> | 39 |
| 2.2.2 <i>Méthode</i> | 40 |
| 2.2.3 <i>Optimisation de la méthode</i> | 42 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3 MÉTHODE DE DOSAGE ENZYMATIQUE DU GLUTATHION..... | 42 |
| 2.4 MODÈLE EXPÉRIMENTAL | 44 |
| 2.5 PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX <i>IN VIVO</i> | 45 |
| 2.5.1 <i>Mesure de l'impact des différentes composantes de la nutrition parentérale sur le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique</i> | 45 |
| 2.5.2 <i>Quantification de l'influence du peroxyde d'hydrogène sur le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique</i> | 48 |
| 2.5.3 <i>Vérification de l'influence antiradicalaire des multivitamines sur le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique</i> | 48 |
| 2.5.4 <i>Comparaison du statut redox du glutathion hépatique d'animaux présentant ou non une cholestase ou une stéatose induite par la nutrition parentérale</i> | 49 |
| 2.6 ANALYSES STATISTIQUES..... | 50 |
| 2.7 DOSAGE DES PEROXYDES | 50 |
| 2.8 DOSAGE DU 8-ISOPROSTANE F _{2A} | 52 |
| 2.9 DOSAGE DE LA GLUTATHION RÉDUCTASE | 53 |
| 2.10 DÉTERMINATION DU DÉBIT BILIAIRE | 54 |
| 2.11 DÉTERMINATION DE LA STÉATOSE | 54 |
| 3. RÉSULTATS | 55 |
| 3.1 VALIDATION D'UNE MÉTHODE D'ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE EN SOLUTION LIBRE AFIN DE PERMETTRE LA DÉTERMINATION SIMULTANÉE DU GLUTATHION SOUS FORME RÉDUITE ET OXYDÉE..... | 56 |
| 3.1.1 <i>L'effet du kV</i> | 56 |
| 3.1.2 <i>Spécificité des pics</i> | 56 |
| 3.1.3 <i>Coefficient de variation</i> | 57 |
| 3.1.4 <i>Seuil de détection</i> | 58 |
| 3.1.5 <i>L'effet de la congélation</i> | 58 |
| 3.1.6 <i>Comparaison de techniques</i> | 59 |
| 3.2 PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX <i>IN VIVO</i> | 60 |
| 3.2.1 <i>Mesure de l'impact des différentes composantes de la nutrition parentérale sur le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique</i> | 60 |
| 3.2.2 <i>Quantification de l'influence du peroxyde d'hydrogène sur le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique</i> | 65 |
| 3.2.3 <i>Vérification de l'influence antiradicalaire des multivitamines sur le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique</i> | 66 |
| 3.2.4 <i>Comparaison du statut redox du glutathion hépatique d'animaux avec ou non une cholestase ou une stéatose induite par la nutrition parentérale</i> | 69 |
| 4. DISCUSSION | 72 |
| 4.1 VALIDATION D'UNE MÉTHODE D'ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE EN SOLUTION LIBRE | 73 |
| 4.2 PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX <i>IN VIVO</i> | 76 |
| 5. RÉFÉRENCES | 84 |

LISTE DES FIGURES

| | | |
|--------------------|--|----|
| Figure 1 : | Schéma simplifié du métabolisme de la méthionine via la voie de la transsulfuration et de la transméthylation..... | 5 |
| Figure 2 : | Réactions chimiques entre la riboflavine et l'acide ascorbique conduisant à la formation du H ₂ O ₂ | 12 |
| Figure 3 : | Schéma du cycle de recyclage du tocophérol par l'entremise de l'acide ascorbique et du glutathion..... | 14 |
| Figure 4 : | Réaction de Fenton..... | 16 |
| Figure 5 : | Réaction de Haber-Weiss..... | 17 |
| Figure 6 : | Schéma de la peroxydation lipidique | 21 |
| Figure 7 : | Terminaisons possibles de la peroxydation lipidique..... | 22 |
| Figure 8 : | Produits de dégradation issus de la peroxydation lipidique | 23 |
| Figure 9 : | Structure du glutathion avec ses différents acides aminés : acide glutamique, cystéine, glycine | 27 |
| Figure 10 : | Cycle γ -glutamyle..... | 29 |
| Figure 11 : | Oxydation du glutathion par la glutathion peroxydase ainsi que son recyclage par la glutathion réductase impliquant la voie des pentoses phosphates | 31 |
| Figure 12 : | Équation de Nernst pour le calcul du potentiel redox du glutathion..... | 33 |
| Figure 13 : | Schéma explicatif du principe du dosage enzymatique du glutathion | 43 |
| Figure 14 : | Schéma démontrant le mode d'infusion de la nutrition parentérale lorsque les animaux reçoivent des acides aminés et lipides | 47 |
| Figure 15 : | Électrophérogramme de la disparition du pic GSH faite à l'aide du N-éthylmaleimide (NEM)..... | 57 |
| Figure 16 : | Variation du temps de congélation sur la concentration du glutathion en mM sur un échantillon hépatique sur une période de 18 mois, allant du mois de novembre 2002 au mois d'avril 2004 | 59 |
| Figure 17 : | Effets des acides aminés-lipides et de l'exposition à la lumière des solutions intraveineuses sur le statut et potentiel redox du glutathion hépatique | 62 |
| Figure 18 : | Paramètres pouvant expliquer l'effet observé sur le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique..... | 63 |

| | |
|--|----|
| Figure 19 : Effets des acides aminés-lipides et de l'exposition à la lumière des solutions intraveineuses au niveau du globule rouge | 64 |
| Figure 20 : L'influence du H ₂ O ₂ au niveau hépatique..... | 65 |
| Figure 21 : L'effet des peroxydes au niveau hépatique..... | 67 |
| Figure 22 : Paramètres pouvant expliquer l'effet de H ₂ O ₂ observé sur le statut et potentiel redox du glutathion hépatique..... | 68 |
| Figure 23 : Relation entre le statut redox du glutathion et les niveaux d' 8-isoprostane F _{2α} hépatique | 68 |
| Figure 24 : Corrélation entre le débit biliaire et le statut redox du glutathion pour la première heure de la collecte biliaire | 69 |
| Figure 25 : Comparaison entre le statut redox du glutathion et la stéatose de deux groupes d'animaux ayant des stéatoses différentes | 70 |
| Figure 26 : Comparaison entre la stéatose et le statut redox du glutathion de deux groupes d'animaux ayant des statuts redox différents | 71 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Composition du contenu des multivitamines, des acides aminés, des lipides, et des oligo-éléments | 46 |
| Tableau 2 : Peroxydes contenus dans les différentes solutions intraveineuses administrés aux animaux | 52 |
| Tableau 3 : Coefficient de variation (CV) de la concentration et du temps de rétention du GSH et GSSG pour les courbes étalons et un échantillon hépatique ainsi que d'un échantillon de globules rouges | 58 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|-------------------------------|---|
| AA | : Acides aminés |
| Acétyl CoA | : Acétyl coenzyme A |
| ACC | : Acétyl CoA carboxylase |
| AH ₂ | : Acide ascorbique ou vitamine C |
| ALT | : Alanine aminotransaminase |
| AP-1 | : Protéine activatrice 1 (<i>activator protein 1</i>) |
| AST | : Aspartate aminotransaminase |
| CO ₂ | : Dioxyde de carbone |
| CV | : Coefficient de variation |
| E _{hc} | : Potentiel redox |
| DHA | : Acide déshydroascorbique |
| Fe ⁺² | : Fer ferreux |
| Fe ⁺³ | : Fer ferrique |
| γGT | : γ-glutamyltranspeptidase |
| GPx | : Glutathion peroxydase |
| GR | : Glutathion réductase |
| GSH | : Glutathion sous sa forme réduite |
| GSSG | : Glutathion sous sa forme oxydée, glutathion dissulfure |
| HA [•] | : Radical ascorbyle |
| HNE | : 4-hydroxynonéal |
| HO ₂ [•] | : Radical hydroperoxyde |
| H ₂ O | : Eau |
| H ₂ O ₂ | : Peroxyde d'hydrogène |
| HPLC | : Chromatographie liquide à haute performance (<i>high performance liquide chromatography</i>) |
| 8-iso-PGF _{2α} | : 8-isoprostane F _{2α} |
| L [•] | : Acide gras radicalaire |

| | |
|------------------------------|--|
| LH | : Acide gras |
| Lip | : Lipide |
| LOO [•] | : Radical hydroperoxyde |
| LOOH | : Lipide hydroperoxydé |
| Lux | : Lumière |
| MDA | : Malonaldéhyde |
| MPA | : Acide méta-phosphorique |
| MV | : Multivitamines |
| NADPH | : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate |
| NASH | : Stéatohépatite non-alcoolique |
| NF- κ B | : Facteur nucléaire kappa B (nuclear factor κ B) |
| NP | : Nutrition parentérale |
| O ₂ | : Oxygène moléculaire |
| O ₂ ^{•-} | : Anion superoxyde |
| OH [•] | : Radical hydroxyle |
| Psi | : Livre par pouce carré (<i>pound square inch</i>) |
| Rf | : Riboflavine ou vitamine B ₂ |
| Rf [•] | : Riboflavine photoexcitée |
| Rf ^{••} | : Riboflavine radicalaire |
| RO [•] | : Radical alkoxyde |
| RO ₂ [•] | : Radical peroxyde |
| ROS | : Espèces radicalaires dérivées de l'oxygène (<i>reactive oxygen species</i>) |
| SH | : Groupement thiol |
| TBA | : Acide thiobarbiturique |
| TBARS | : Substances réactives à l'acide thiobarbiturique |

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier ma mère, mon père et ma sœur pour leurs nombreux encouragements, leurs précieux conseils et leur confiance en moi. Tout ceci m'a permis de persévérer, d'avancer dans la vie et de réaliser mes rêves.

Un merci très sincère dédié à mon directeur de recherche, Jean-Claude, pour m'avoir encouragée à continuer et à persévérer, pour m'avoir transmis le goût du savoir et la passion de la recherche. Merci pour m'avoir fait confiance.

J'aimerais remercier Thérèse pour m'avoir aidée dans mes recherches, pour avoir effectué les chirurgies et pris soin de mes animaux. Je te dis merci de m'avoir encouragée et écoutée.

Merci aux docteurs Pierre Brochu et Fernando Alvarez pour avoir évalué le degré de stéatose de mes animaux.

Pour terminer, j'aimerais aussi dire un gros merci à mes confrères et consœurs, des laboratoires 1725 et 1726, Pierre-André, Karine et Annie sans qui la vie de laboratoire aurait été beaucoup moins joyeuse et palpitante !

AVANT-PROPOS

La nutrition parentérale est connue pour être associée à des complications hépatiques telles la cholestase chez l'enfant et la stéatose chez l'adulte. Toutefois, l'étiologie de ces complications est mal connue. Plusieurs données suggèrent que le stress oxydant semble jouer un rôle dans ces pathologies. Il est également connu que les solutions de nutrition parentérale sont contaminées par des sources oxydantes comme le peroxyde d'hydrogène qui est trouvé en plus grande concentration par rapport aux peroxydes organiques. La charge oxydante générée par ces peroxydes lors de l'infusion de la nutrition parentérale peut créer un stress oxydant à l'organisme. Ce stress oxydant peut affecter le statut et le potentiel redox du couple redox GSSG/GSH du glutathion hépatique. Le glutathion est un système ubiquitaire de défense antioxydante. Ainsi la mesure du couple redox GSSG/GSH peut être un indice du stress oxydant hépatique.

Ce projet de maîtrise vise à valider l'hypothèse de travail à savoir que : 1) la nutrition parentérale influence le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique; et 2) la cholestase et la stéatose, induites par la nutrition parentérale, sont associées à une modification de ce statut et ce potentiel redox. Cependant, l'objectif premier est d'établir l'association entre la nutrition parentérale et le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique. Pour y arriver, il faut tout d'abord valider une méthode d'électrophorèse capillaire en solution libre pour la détermination simultanée du GSH et GSSG, et comparer cette méthode à la technique enzymatique de Griffith, et par la suite, réaliser quatre protocoles animaux.

Ainsi, pour une meilleure lecture, ce mémoire se subdivise en quatre parties principales. Dans l'introduction vous trouverez une définition de la nutrition parentérale ainsi qu'une brève description de la cholestase et de la stéatose, complications hépatiques reliées à ce mode d'alimentation. Vous trouverez également, l'implication probable du stress oxydant dans l'étiologie de ces problèmes hépatiques. Une section traitera de la présence de peroxyde d'hydrogène survenant dans les solutions de nutrition parentérale, et une autre définira ce que sont un oxydant et un antioxydant. Le stress oxydant ainsi que les marqueurs d'identification de ce stress seront également abordés. Une attention particulière

sera accordée au glutathion et à son métabolisme puisqu'il s'agit de l'antioxydant privilégié dans ce mémoire. Dans la partie matériel et méthodes, vous trouverez la mise au point d'une méthode par électrophorèse capillaire en solution libre, précise et performante, de la quantification du glutathion réduit et oxydé sera décrite en détails afin de déterminer le statut et potentiel redox du glutathion. De plus, vous trouverez la description du modèle animal ainsi que les protocoles *in vivo* visant à vérifier les l'hypothèse de travail citée ci-dessus. Il est à noter que les résultats présentés dans ce mémoire feront l'objet de publications. Ainsi, un article traitant de l'association cholestase-statut redox est déjà soumis à J Pediatr Gastrol Nutr (juillet, 2004) et un second concernant l'influence de la nutrition parentérale sur le potentiel redox sera écrit en tant qu'auteur principale. Quelques pistes pour des études ultérieures seront indiquées dans la discussion. Bonne lecture à tous !

1. INTRODUCTION

1.1 NUTRITION PARENTÉRALE ASSOCIÉE À DES COMPLICATIONS HÉPATIQUES

1.1.1 Nutrition parentérale

La nutrition parentérale (NP) a eu un impact révolutionnaire sur la survie et le développement de l'enfant prématuré ou de faible poids à la naissance (< 1 000 g) ne pouvant se nourrir par la bouche (Beale et al, 1979 ; Horst et al, 2004). Ce moyen de nutrition est aussi utilisé chez l'adulte lorsqu'il y a un dysfonctionnement du tractus gastro-intestinal comme l'incapacité digestive, la mauvaise absorption ou encore lors de chirurgies (Barvick et al, 1989). Le but de la NP est de fournir tous les éléments nutritionnels essentiels au maintien et au développement normal de l'organisme de l'être humain tels que des glucides, vitamines, acides aminés, lipides et minéraux (Ernst et al, 1998 ; Kelly et al, 1998). Cependant, l'utilisation de ce mode de nutrition est associée à des complications hépatiques telles que la cholestase et la stéatose.

1.1.2 Rôle du stress oxydant dans les complications hépatiques reliées à la nutrition parentérale

L'étiologie de la cholestase et de la stéatose hépatique associées à la NP est encore mal connue de nos jours et origine probablement de causes multifactorielles. Plusieurs études démontrent que 40 à 60 % des enfants, recevant une NP prolongée développent une dysfonction hépatique (Allard, 2002 ; Kelly, 1998). Les complications hépatiques secondaires à la NP diffèrent chez l'enfant de chez l'adulte. La cholestase est plus souvent documentée chez l'enfant et le nouveau-né prématuré ou de faible poids à la naissance (Beale et al, 2003 ; Btaiche et al, 2002), alors que la stéatose est communément observée chez l'adulte.

1.1.2.1 Cholestase

La cholestase est définie par une diminution du débit biliaire (Horst et al, 2004). Le débit biliaire est connu pour être dépendant des acides biliaires et du glutathion (jusqu'à environ 50 % du débit) (Ballatori et al, 1989 ; Erling, 1996 ; Mohan et al, 1994 ; Morán et al, 1998). Un changement de sécrétion des constituants de la bile, dont les acides biliaires et le glutathion, peuvent expliquer une réduction du débit biliaire. Le glutathion est le principal anion organique, autre que les acides biliaires, à être excrété dans la bile (Gibson et al, 2004). Celui-ci agirait comme force osmotique pour la formation du volume biliaire (Erling, 1996 ; Mohan et al, 1994).

Il est bien connu que la cholestase associée à la NP est surtout observée chez les nouveau-nés prématurés. Peden et collaborateurs ont été les premiers à rapporter cette association (Penden et al, 1971). En fait, l'incidence de la cholestase augmente avec la durée de la NP (Beale et al, 1979 ; Farrell et al, 2001 ; Teitelbaum et al, 2001). Beale et coll. ont démontré que les bébés nés avec un faible poids de naissance (< 1 000 g) et recevant une NP sur une période de 42 jours ont développé dans 50 % des cas une cholestase. Cette incidence est diminuée à 7 % quand le poids est supérieur à 1 500 g (Beale et al, 1979). Ces résultats suggèrent que l'immaturation physiologique, particulièrement celle des fonctions biliaires dont l'immaturation du système sécrétoire de la bile, soit en cause (Beale et al, 1979 ; Horst et al, 2004 ; Quigley et al, 1993 ; Touloukian et al, 1975). Watkins et coll. ont rapporté que le volume, la synthèse et la concentration intestinale des sels biliaires sont faibles comparés à ceux d'enfants à terme (Watkins et al, 1975). De plus, la sécrétion d'ions organiques tel le glutathion est diminué chez le nouveau-né (Ballatori et al, 1982).

Il n'existe pas de test spécifique pour la détermination de la cholestase associée à la NP. Cependant, il existe certains marqueurs biochimiques plasmatiques qui aident au diagnostic. L'élévation de la bilirubine conjuguée supérieure à 2,0 mg/dL (Beale et al, 1979 ; Btaiche et al, 2002 ; Merritt, 1986) est le test le plus fiable. Une concentration plasmatique accrue d'acides biliaires corrobore le diagnostic (Horst et al, 2004 ; Narkewick, 2004 ; Teitelbaum et al, 2001). Les transaminases hépatiques, soit l'alanine aminotransaminase (ALT), l'aspartate aminotransaminase (AST) ainsi que les enzymes γ -

glutamyltranspeptidase (γ GT) et phosphatase alcaline, sont d'autres marqueurs enzymatiques utilisés pour le diagnostic des désordres hépatiques. Les transaminases hépatiques suggèrent un dommage à l'hépatocyte, alors qu'une augmentation de la γ GT, marqueur des cellules ductulaires, ou de la phosphatase alcaline est indicatrice de dommage à la voie biliaire (Horst et al, 2004 ; Kelly, 1998). Les élévations de bilirubine conjuguée, phosphatase alcaline et l'AST sont respectivement observées après $2,2 \pm 0,2$ ($n = 92$); $4,0 \pm 0,8$ ($n = 74$) et $4,6 \pm 0,7$ ($n = 83$) semaines (moyenne \pm SEM) de NP chez des bébés prématurés (poids $< 2\ 500$ g) (Postuma et al, 1979 ; Teitelbaum et al, 2001). Ces données suggèrent donc un dommage initial principalement à la voie biliaire. Ces valeurs reviennent habituellement à la normale après l'arrêt de la NP. La bilirubine conjuguée quant à elle, revient à la normale une semaine à deux mois après la fin de la NP (Beale et al, 1979 ; Postuma et al, 1979 ; Touloukian et al, 1975). Même si les marqueurs plasmatiques peuvent revenir à la normale après l'arrêt de la NP, la cholestase peut évoluer vers la cirrhose, la fibrose et la nécrose (Gibson et al, 2004).

Les causes conduisant à une cholestase associée à une NP sont multiples. Bathia et ses acolytes suggèrent que la NP exposée à la lumière provoque une diminution du débit biliaire après une infusion de dix jours (Bhatia et al, 1993). De plus, ils suggèrent que les acides aminés soient les nutriments responsables des altérations des fonctions hépatobiliaires. En fait, ils ont préalablement rapporté que le tryptophane, la méthionine, la tyrosine, l'histidine et la cystéine sont rapidement oxydés en présence de photosensibilisateur comme la riboflavine (Bhatia et al, 1983). À la section 1.2, nous verrons que la riboflavine est impliquée dans la génération de peroxydes. Les travaux de Bathia suggèrent donc qu'une oxydation de certains types d'acides aminés puisse être une cause de la cholestase.

Dans le même sens, Moss et coll. ont suggéré que la méthionine, acide aminé essentiel, puisse être impliquée dans la cholestase (Moss et al, 1999). La méthionine est métabolisée via la voie de la transsulfuration et transméthylation (**figure 1**), laquelle est impliquée dans la formation de la cystéine. La concentration cellulaire de cette dernière influence directement le taux de synthèse du glutathion, molécule clé de la défense antioxydante. Cependant, l'activité de la cystathionase, enzyme limitante dans la synthèse de

cystéine, est basse, voire inexistante chez l'enfant prématuré (Zlotkin et al, 1982) créant une diminution de la cystéine et par le fait même, un excès de méthionine qui serait toxique pour le foie (Moss et al, 1999). Puisque la cystéine est un substrat de la synthèse du glutathion, cette immaturité pourrait contribuer à la susceptibilité du foie à une charge oxydante (Btaiche et al, 2002 ; Moss et al, 1999 ; Teitelbaum et al, 2001). Ces données suggèrent donc l'hypothèse que les paramètres excrétoires contribuant au débit biliaire sont affectés par un stress oxydant.

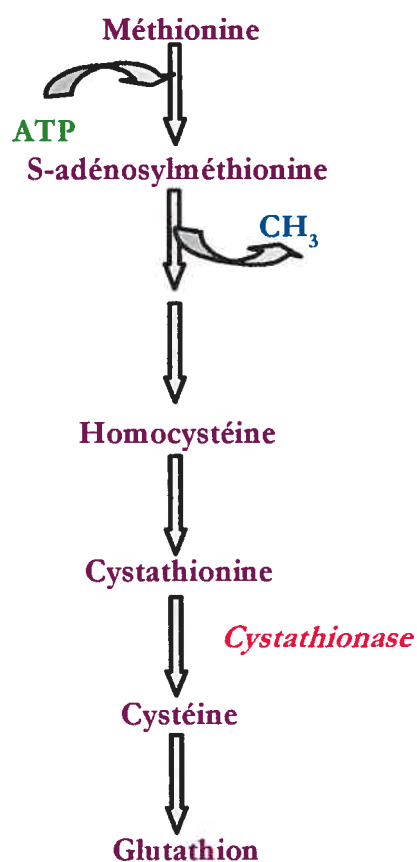


Figure 1 : Schéma simplifié du métabolisme de la méthionine via la voie de la transsulfuration et de la transméthylation. Adapté de Btaiche et al, 2002 et Moss et al, 1999.

Le groupe de Shattuck a démontré que l'infusion de solutions contenant des acides aminés et des vitamines dans un foie isolé provoque une diminution du débit biliaire

(Shattuck et al, 1995). Ce débit est abaissé quand les solutions sont exposées à la lumière pendant 24 heures. L'exposition de solutions d'acides aminés et de vitamines crée une élévation significative de la concentration biliaire en glutathion oxydé (GSSG) par rapport à la concentration en glutathion réduit (GSH) (Shattuck et al, 1995). Nous verrons à la section 1.2 que l'exposition à la lumière de la composante multivitaminée de la NP, contenant de la riboflavine, génère des peroxydes. Il est plausible de penser que les solutions de NP exposées à la lumière créent ainsi un stress oxydant au foie, et que l'excédant de GSSG soit sécrété dans la bile.

Weinberger B et coll. ont démontré, chez l'enfant, une corrélation entre les injures hépatiques observées par l'élévation des transaminases plasmatiques et le MDA (Weinberger et al, 2002). Ceci suggère que le stress oxydant soit associé avec des injures hépatocellulaires chez les enfants prématurés recevant une NP. Parallèlement, Sokol et coll. avaient démontré la même corrélation au niveau des mitochondries hépatiques d'animaux (Sokol et al, 1991).

Cependant, Belli et ses collaborateurs ont rapporté que des rats auxquels étaient administrés une NP composée de dextrose et d'acides aminés ou de dextrose, d'acides aminés et de lipides présentaient une diminution du débit biliaire ainsi qu'un stress oxydant, mais ces deux changements n'étaient pas corrélés. Ils ont également démontré que c'est lors de l'ajout des lipides que le débit biliaire est davantage diminué, mais que les injures hépatiques ne se sont pas augmentées. Il a d'ailleurs été démontré, dans ce même papier, que l'ajout d'homocystéine, précurseur métabolique de la cystéine et donc du glutathion, augmente significativement le flux biliaire (Belli et al, 2003).

De récentes études suggèrent que la formation des espèces radicalaires dérivées de l'oxygène (ROS) soit secondaire à la cholestase hépatique (Parola et al, 1996 ; Sokol et al, 1991 ; Weinberger et al, 2002). Une cholestase induite par une ligature chirurgicale du conduit biliaire chez le rat induit une augmentation des produits de dégradation de la peroxydation lipidique, particulièrement le malonaldéhyde (MDA) (Alptekin et al, 1997 ; Parola et al, 1996). L'exposition d'hépatocytes isolés de rat à des acides biliaires hydrophobes mène à une production intracellulaire de espèces radicalaires dérivées de

l'oxygène (ROS) ainsi qu'à une peroxydation lipidique (Sokol et al, 1993). Weinberger B et coll. ont aussi démontré chez l'enfant qu'il n'y avait pas de corrélation entre le stress oxydant, mesuré à l'aide de marqueurs la peroxydation lipidique, soit les TBARS urinaires, et la cholestase (Weinberger et al, 2002).

Bref, toutes ces études suggèrent que le stress oxydant est associé à la cholestase, cependant, il pourrait être secondaire à la diminution du débit biliaire. Puisqu'au laboratoire d'accueil, le débit biliaire était mesuré chez certains animaux, il m'a été facile de vérifier si le débit biliaire était corrélé avec une modification hépatique du statut redox du glutathion, ceci correspond alors à la seconde partie de mon hypothèse de travail . Il est possible que ce changement redox du glutathion, soit antérieur à la production de marqueurs de peroxydation lipidique.

1.1.2.2 Stéatose

La stéatose hépatique ou foie gras, se définit comme étant une accumulation lipidique dans le cytoplasme de l'hépatocyte (Fong et al, 2000). La proportion des lipides, surtout les triglycérides, peut représenter jusqu'à environ 50 % du poids du foie (Burt et al, 1998). L'accumulation lipidique est variable, allant de vacuoles dispersées dans les cellules à un dépôt plus répandu dans la majorité des hépatocytes. La distribution hépatique du gras est initialement périportale, mais dans le cas de stéatose sévère elle s'étend plutôt du côté panlobulaire ou centrolobulaire (Baker et al, 1987 ; Quingley et al, 1993 ; Touloukian et al, 1982).

Histologiquement, le foie gras peut être classifié selon la taille des vacuoles lipidiques présentes : macrovésicules ou microvésicules. Les hépatocytes qui contiennent des macrovésicules sont distendues par une grosse et simple vacuole lipidique qui déplace le noyau en périphérie. Ce type de vacuole est retrouvé dans la stéatose associée à la NP. Les microvésicules sont de plus petites vacuoles finement dispersées dans le cytoplasme de l'hépatocyte où le noyau demeure en position centrale (Burt et al, 1998 et Fong et al, 2000).

La stéatose est rarement symptomatique, bien qu'occasionnellement les patients atteints puissent ressentir quelques malaises hépatiques au niveau du cadran supérieur droit (Baker et al, 1987 ; Nightingale, 2003 ; Quigley et al, 1993). C'est probablement une des raisons pourquoi elle est peu documentée et recherchée chez le nouveau-né. Toutefois, la stéatose peut être suspectée par une hépatomégalie avec une augmentation transitoire des transaminases plasmatiques (Baker et al, 1987 ; Kelly, 1998 ; Quigley et al, 1993; Tulikoura I et al, 1982). Cependant, Sax et coll. n'ont démontré qu'une faible corrélation entre le niveau des enzymes hépatiques et l'infiltration de gras hépatique (Sax et al, 1986). La stéatose peut être détectée par des techniques radiographiques telles que les ultrasons, l'imagerie tomographique ou à résonance magnétique nucléaire (Jacobs et al, 1986) ainsi que par biopsie hépatique (Diehl, 1999 ; Fong et al, 2000), méthode fiable et très pratiquée. Chez l'adulte, la stéatose peut être documentée deux semaines après l'initiation de la NP (Farrell et al, 2001 ; Fong et al, 2000 ; Kelly, 1998 ; Nightingale, 2003).

Le foie gras qui est une modification morphologique due à une accumulation de triglycérides peut-être considéré comme une pathologie. Puisqu'il peut également évoluer vers une pathologie plus importantes soit, une stéatohépatite non-alcoolique (NASH) et éventuellement vers une nécrose (Bacon et al, 1994 ; Day et al, 1998 ; Day, 2002).

Plusieurs facteurs peuvent contribuer à une accumulation de gras dans le foie, par exemple une augmentation du flux d'acides gras libres au niveau hépatique, une augmentation de la synthèse endogène d'acides gras, une diminution de la β -oxydation mitochondriale des acides gras, une diminution de la synthèse et/ou de la sécrétion de lipoprotéines. La littérature suggère fortement qu'une élévation de la lipogenèse hépatique et une diminution du transport hépatique soient importantes dans le développement de la stéatose associée à la NP (Baker Al et al, 1987 ; Chitturi et al, 2001; Rao et al, 2001).

L'une des causes suggérée de l'induction de la stéatose par la NP est une surcharge en glucose (> 350 kcal/kg/d) (Baker et al, 1987 ; Keim, 1987 ; Meguid MM, et al, 1991; Nakagawa M et al, 1991 ; Sax et al, 1986 ; Tulikoura et al, 1982). L'infusion de glucose augmente la sécrétion d'insuline, ce qui résulte en une augmentation de l'activité hépatique

de l'acétyl CoA carboxylase (ACC) et de l'acide gras synthétase, enzymes clés de la lipogenèse (Baker et al, 1987 ; Hall et al, 1984 ; Sax et al, 1986; Tulikoura I et al, 1982). De plus, le glucose est un substrat de la glycolyse produisant l'acétyl coenzyme A (acétyl CoA), le substrat de l'ACC. Les acides gras essentiels par exemple l'acide linoléique, inhibent le développement du foie gras agissant via l'inhibition des enzymes ACC et glucose-6-phosphate déshydrogénase causant ainsi l'inhibition de la synthèse des acides gras à partir du glucose (Hall et al, 1984 ; Nakagawa et al 1991). Hall et coll. suggère que la supplémentation en solutions lipidiques peut prévenir la stéatose en diminuant la capture de triglycérides hépatiques (Hall et al, 1984). L'accumulation de graisse au niveau hépatique n'est pas observée lorsque la solution de NP contient des lipides (Reif S et al, 1991). Cependant, la stéatose peut aussi résulter d'un excès lipidique lorsque plus de 50 % des calories proviennent de ceux-ci, causant alors un dépôt exogène directe d'acides gras dans le foie (Boelhouwer et al, 1983; Keim, 1987; Quigley et al, 1993).

Quelques données rapportées ci-dessus suggèrent que les lipides pourraient prévenir ou du moins diminuer la stéatose. Cependant, dans le monde néonatal, d'un point de vue clinique, les apports nutritionnels sont plus important que les problèmes hépatiques ainsi les composantes de la NP sont administrées de façon graduelle selon la condition du patient. Le clinicien vise à administrer la nutrition la plus complète possible. Ainsi, très tôt dans la vie du prématuré les lipides sont incorporés. Ceci pourrait alors, expliquer pourquoi la stéatose n'est pas reconnue comme une complication hépatique chez le prématuré.

Une corrélation directe entre la proportion de calories totales administrée dans la NP et la stéatose examinée par histologie ainsi que par quantification du contenu en triglycéride a été démontré par Meguid et collaborateurs. Ils proposent que de grandes concentrations de glucose et d'acides aminés infusées promouvaient le dépôt de gras hépatique par stimulation de la sécrétion de l'insuline. Cette hormone favorise la lipogenèse et inhibe la carnitine acyltransférase mitochondriale, enzyme transportant les acides gras dans la mitochondrie, pour leur l'oxydation (Meguid et al, 1991). De plus, Keim a rapporté qu'un excès d'acides aminés peut également contribuer à une accumulation de gras dans le foie dû à un excès d'atomes de carbone disponibles pour la synthèse de lipides (Keim, 1987).

Solkol et coll. ont rapporté que l'administration de NP à des rats sur une période de 8 jours cause une réduction du glutathion hépatique, une augmentation de peroxydation lipidique mitochondriale ainsi qu'une stéatose (Sokol et al, 1996). Heyman a également observé une déplétion en glutathion lorsque des rats étaient alimentés par NP (Heyman et al, 1984). Ceci suggère l'hypothèse qu'une déplétion en glutathion puisse être une cause, un effet ou un effet indépendant de la stéatose hépatique. Toutefois, la relation entre une déplétion en glutathion et la stéatose reste à être établie. Il est aussi suggéré que la baisse du glutathion hépatique puisse être due aux solutions d'acides aminés dépourvues en cystéine (Sokol et al, 1996). Chez les nouveau-nés, la capacité à synthétiser la cystéine à partir de la méthionine est faible (Zlotkin et al, 1982). De plus, la disponibilité de la cystéine est le facteur limitant dans la synthèse du glutathion. Ceci est supporté par les travaux de Chessex et coll. effectués chez le cochon d'Inde nouveau-né lesquels démontrent que l'ajout d'acides aminés dans la NP augmente le glutathion hépatique (Chessex et al, 1999). De plus, il a été rapporté que les esters du glutathion, qui traversent facilement la membrane cellulaire, peuvent augmenter les réserves cellulaires en glutathion. Cependant, certains esters peuvent être toxiques, puisqu'il y a deux moles d'éthanol ou de méthanol de produit pour chaque mole de glutathion de formé intracellulairement (Levy et al, 1993; Robinson et al, 1992).

La concentration hépatique en glutathion peut également être modifiée par un apport excessif en peroxydes. Il est connu que les solutions de NP contiennent des peroxydes générés par l'action de la lumière sur la riboflavine (Lavoie et al, 1997 (b); Laborie et al, 1998). Chessex et coll. ont d'ailleurs rapporté que des solutions de NP contenant différentes préparations multivitaminées et exposées à la lumière, induisent une stéatose hépatique chez le modèle du cochon d'Inde âgé de 3 jours de vie, tandis que l'absence de riboflavine dans la NP est associée à un foie exempt de stéatose (Chessex et al, 2002). Toutefois, leurs résultats suggèrent que les peroxydes et/ou les radicaux libres ne soient pas directement impliqués dans l'induction de la stéatose. En fait, aucune corrélation entre la stéatose histologique et les niveaux d'8-isoprostane F_{2x} hépatique, marqueur de peroxydation lipidique, n'a été observée (Chessex et al, 2002). Les lipides contenus dans la NP contiennent des peroxydes (Helbock et al 1993 ; Neuzil et al, 1995) et peuvent générés d'autres molécules oxydantes (Pitkänen O et al, 1991; Silvers et al, 2001) via leur

peroxydation. Il est possible que le stress oxydant, associé à la NP, provoque une oxydation du glutathion réduit (GSH) en sa forme oxydée (GSSG) puisqu'il a la capacité de réduire les peroxydes et les ROS. De plus, il a été rapporté que le H_2O_2 mimait les propriétés de l'insuline en promouvant l'augmentation du transport et l'utilisation du glucose, et par le fait même la lipogenèse (May et al, 1979).

Ceci mène à la deuxième partie de l'hypothèse de mes travaux de maîtrise laquelle stipule qu'une modification du potentiel redox du glutathion hépatique, causée par la présence de peroxyde contaminant la solution de NP, est impliqué dans la stéatose hépatique associée à la NP.

Ainsi les prochaines parties de cette section traiteront de la génération de peroxydes dans les solutions de NP, de stress oxydant, du système du glutathion ainsi que du statut et potentiel redox du glutathion.

1.2 GÉNÉRATION DE PEROXYDE D'HYDROGÈNE DANS LA NUTRITION PARENTÉRALE

Il est bien connu que les solutions de NP composées d'un mélange d'acides aminés (Bhatia et al, 1983 ; Brawley et al, 1993), lipides (Helbock et al 1993 ; Neuzil et al, 1995), vitamines (Lavoie et al, 1997 (b); Laborie et al, 1998) et d'additifs comme le polysorbate (Lavoie et al, 1997 (b)) génèrent des peroxydes lorsqu'elles sont exposées à la lumière ambiante. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) généré par l'exposition des multivitamines à la lumière constitue 80 % (Lavoie et al, 1997 (b)) des peroxydes retrouvés dans les solutions de nutrition et le 20 % restant est constitué de peroxydes organiques provenant entre autres des lipides (Helbock et al, 1993). Les paragraphes suivants vont démontrer l'implication des principaux constituants des solutions de NP à la génération de peroxydes.

La formation de H_2O_2 est catalysée par l'excitation de la riboflavine (vitamine B_2) ($\lambda = 300$ et 500 nm) exposée à la lumière ambiante, ce qui permet le transfert d'électrons entre une molécule donatrice (acide ascorbique) et l'oxygène dissout. Le mécanisme d'action

entre la riboflavine et l'acide ascorbique est illustré à la **figure 2** (Kim et al, 1993; Laborie et al, 1998; Laborie et al, 1999). Premièrement, la riboflavine est excitée par la lumière (lux) formant une molécule de riboflavine excitée (Rf^{*}). Celle-ci réagit avec un agent réducteur soit l'acide ascorbique (AH₂) et génère la molécule de riboflavine réduite et radicalaire (Rf[•]) ainsi que le radical de l'acide semidéshydroascorbique (HA[•]). La riboflavine radicalaire réagit alors avec l'oxygène dissout dans la solution donnant ainsi l'anion superoxyde (O₂[•]) et reforme la vitamine B₂. L'O₂[•] forme le H₂O₂ en se combinant avec deux protons H⁺ provenant de l'ascorbyle qui devient l'acide déshydroascorbique (DHA).

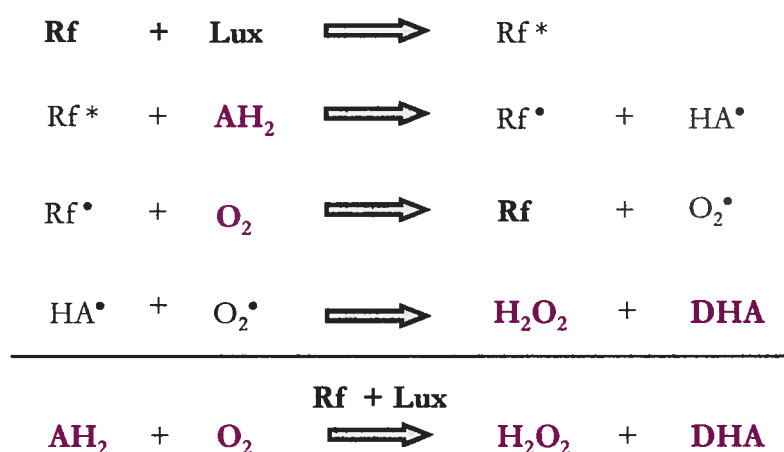


Figure 2 : Réactions chimiques entre la riboflavine et l'acide ascorbique conduisant à la formation du H₂O₂. Lux : lumière, Rf : riboflavine, Rf^{*} : riboflavine excitée, Rf[•] : riboflavine radicalaire, AH₂ : acide ascorbique, HA[•] : radical de l'acide semidéshydroascorbique, DHA : acide déshydroascorbique. Adapté de Kim et al, 1993; Laborie et al, 1998.

La réaction globale suggère quatre moyens d'enrayer la formation de peroxyde dans la NP. Protéger la NP contre la lumière est un moyen qui peut être utilisé de façon expérimentale à l'aide de sac protecteur de couleur jaune coupant la longueur d'onde excitant la riboflavine (Laborie et al, 1999). Cependant, cela devient plus difficile et laborieux au niveau de la pratique clinique puisqu'il faut mettre à l'abri de la lumière les sacs de NP et toutes les tubulures annexées. De plus, cette protection doit être effectuée dès la

préparation du mélange de la NP. Enlever l'oxygène dissout est une autre possibilité envisageable, mais il faut que cela soit fait dès la préparation de la solution de la NP. Une autre possibilité de procéder est d'administrer la riboflavine de façon isolée. Cependant, notre laboratoire a démontré dans une étude préliminaire que la riboflavine exposée à la lumière ambiante et administrée de manière isolée générerait un stress oxydant. La dernière possibilité est d'isoler l'acide ascorbique. Toutefois, ceci provoquerait l'instabilité des autres composantes contenues dans les multivitamines (communication personnelle de la compagnie SABEX).

L'acide ascorbique, plus communément connu sous le nom de vitamine C, a des propriétés antioxydantes et joue un rôle important dans l'organisme. Cette vitamine hydrosoluble (Halliwell et al, 1992 ; Halliwell, 2001) est synthétisée *de novo* par la voie de l'acide hexuronique située au niveau hépatique ou rénal chez la plupart des espèces possédant l'enzyme gulonolactone oxydase (L-gulonolactone oxydase) (Banhegyi et al, 1997 ; Halliwell, 2001). L'acide ascorbique doit être absorbé chez l'homme, les primates et le cochon d'Inde dû à l'absence de gulonolactone oxydase (Banhegyi et al, 1997 ; Halliwell, 2001). En cas de carence alimentaire, un scorbut sera provoqué ainsi qu'une augmentation du stress oxydatif (Lykkesfeldt, 2002). Le modèle du cochon d'inde nouveau-né est choisi afin d'étudier les complications hépatiques associées à la NP, car tout comme l'humain, l'acide ascorbique est une vitamine et doit être obtenue de façon exogène.

L'acide ascorbique ayant conféré sa capacité antioxydante en donnant un électron à une molécule oxydante, devient à son tour radicalaire sous l'appellation d'acide semidéshydroascorbique. De plus, la même transformation radicalaire survient lorsqu'elle régénère le tocophérol, autre antioxydant de l'organisme (Halliwell et al, 1990). L'acide ascorbique radicalaire subira une oxydation en perdant son deuxième électron formant le DHA (Banhegyi et al, 1997 ; Halliwell, 1996 ; Lykkesfeldt, 2002; Winkler et al 1994). Par la suite, le DHA est recyclé en acide ascorbique par le système du glutathion (**figure 3**). Un tel recyclage joue alors un rôle clé dans les fonctions antioxydantes surtout chez les espèces qui sont incapables de la synthétiser. Pour les autres espèces, d'un point de vue énergétique, il est plus avantageux de recycler la forme oxydée de l'acide ascorbique que d'en synthétiser à nouveau (Banhegyi et al, 1997). Le DHA peut être recyclé par différentes réactions, soit

de façon enzymatique à l'aide de la DHA réductase NADPH-dépendante par exemple dans le foie du rat ou soit de façon non enzymatique à l'aide du glutathion comme dans le globule rouge (Meister, 1994 (a) (b) ; Lykkesfeldt, 2002 ; Winkler et al, 1994). Ce métabolite pourrait avoir un impact sur le statut redox du glutathion.

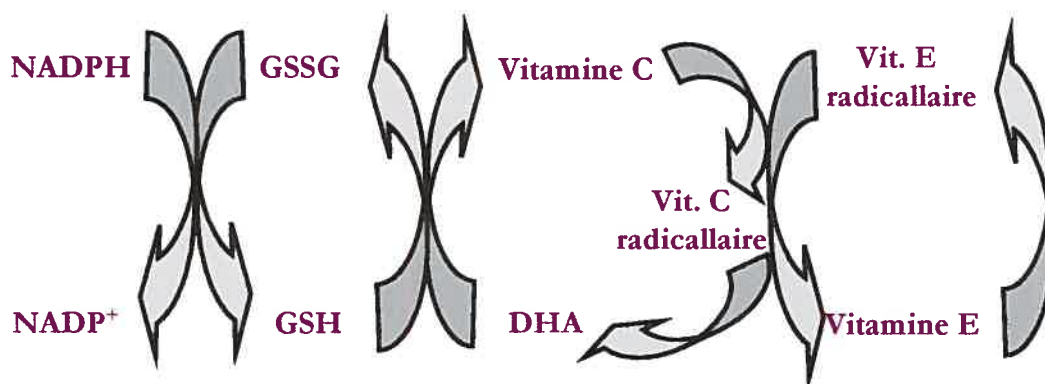


Figure 3 : Schéma du cycle de recyclage du tocophérol par l'entremise de l'acide ascorbique et du glutathion. Adapté de Winkler et al, 1994.

En fait, la majorité des peroxydes retrouvée dans la nutrition intraveineuse dépend de la concentration de la composante multivitaminée, plus précisément des vitamines B et C (Lavoie et al, 1997 (b) ; Laborie et al, 2000 (b)).

Des études effectuées par le groupe de Bravelly et coll. ont montré qu'une solution d'acides aminés exposée à la lumière en présence de riboflavine génère des H₂O₂ et que cette production était proportionnelle à la concentration de riboflavine (Braveley et al, 1993). Bathia et ses collègues (Bathia et al, 1980, 1991, 1993) ont aussi clairement démontré qu'en présence de multivitamines, certains acides aminés (le tryptophane, la tyrosine, la méthionine, la cystéine et la phénylalanine) étaient sujets à une photo-oxydation. De plus, ce laboratoire a aussi montré que des changements à la baisse se produisaient autant *in vivo* qu'*in vitro* dans les concentrations d'acides aminés spécifiques (la méthionine, la proline, le tryptophane, la tyrosine et l'histidine) ainsi que dans la concentration de riboflavine lorsque ceux-ci étaient exposés à la lumière. Ils ont d'ailleurs rapporté que l'oxydation pouvait avoir

lieu via la génération de H_2O_2 (Bhatia et al, 1980, 1983). Ceci est une hypothèse retenue par Bathia et coll. comme étant un des facteurs conduisant à la cholestase (Bathia et al, 1983), où le stress oxydant serait le dénominateur commun.

Les lipides agissent aussi comme donneurs d'électrons, au même titre que l'acide ascorbique ou les acides aminés lorsque les multivitamines sont mises en présence d'Intralipid (Pharmacia inc) *in vitro*, une augmentation des peroxydes est observée (Lavoie et al, 1997 (b) ; Laborie et al, 1998). Ce phénomène est paradoxal puisque les multivitamines qui ont des propriétés antioxydantes, n'empêchent pas la génération de peroxydes dans les solutions de NP (Lavoie et al, 1997 (b) ; Chessex et al, 2001).

1.3 OXYDANT ET ANTIOXYDANT

1.3.1 Oxydant

Un oxydant se définit comme un capteur d'électron pour devenir réduit, alors qu'un atome possédant un seul électron sur sa dernière orbite électronique est décrit comme une espèce radicalaire (Halliwell et al, 1992 ; Halliwell, 1994). L'oxygène est l'une des principales sources de radicaux retrouvés dans l'organisme. L'oxygène moléculaire (O_2) est, à l'état fondamental, un biradicalaire avec deux électrons célibataires. La réduction de l' O_2 formera des intermédiaires très réactifs comme l'anion superoxyde (O_2^{\bullet}). Ce dernier formera du H_2O_2 par l'entremise du superoxyde dismutase. Le H_2O_2 en présence de métaux de transition générera un radical hydroxyle (OH^{\bullet}). Les ROS sont, entre autres, l'anion superoxyde (O_2^{\bullet}), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), le radical alkoxyde (RO^{\bullet}) et le radical peroxyde (RO_2^{\bullet}). Ce sont des radicaux libres continuellement produits *in vivo*. Le H_2O_2 fait aussi partie de la famille des ROS, même s'il est non radicalaire (Halliwell, 1996).

L'atome ayant la particularité d'avoir un électron non-pairé possède une très grande réactivité. L'électron célibataire est désigné par un point en exposant. Ainsi, la molécule

d'oxygène devrait être représentée par " $\cdot\text{O}-\text{O}\cdot$ ". Cependant, par convention on écrit O_2 . Comme la molécule est réactive, l'atome tentera de combler son orbitale ou de se départir de l'électron supplémentaire afin d'abaisser son niveau énergétique. Ayant baissé son niveau d'énergie, la nouvelle molécule se retrouve dans un état dit "réduit". La molécule qui fournit l'électron manquant est dite "antioxydante". (Halliwell et al, 1992; Halliwell, 1994)

Les radicaux libres peuvent réagir de trois manières différentes avec de nombreuses molécules afin de provoquer une réaction en chaîne. Premièrement, l'atome ou la molécule radicalaire arrache l'électron manquant à une molécule qui ne comporte pas d'électron célibataire, formant ainsi une nouvelle particule radicalaire. Deuxièmement, il donne son électron célibataire à une autre molécule. Troisièmement, il se lie à une molécule cible et cette dernière gardera le caractère radicalaire. Le moyen d'arrêter cet enchaînement radicalaire est la liaison entre deux molécules radicalaires qui combineront leur électron non-pairé pour former un lien covalent entre elles (Halliwell et al, 1992; Halliwell, 1994).

1.3.1.1 Peroxyde d'hydrogène

Le H_2O_2 possède des propriétés oxydantes avec différents ions métalliques transitoires et induit la formation de radicaux libres (Halliwell et al, 1992 ; 2000). Par exemple, le fer ferreux (Fe^{+2}) réagira avec le H_2O_2 pour former le radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$), espèce hautement réactive. Ceci est alors appelé : réaction de Fenton (**figure 4**) (Halliwell et al, 1992).



Figure 4 : Réaction de Fenton

Le Fe^{+3} formé peut aussi interagir avec une molécule d'oxygène pour former du Fe^{+2} pouvant à son tour réagir avec du H_2O_2 . Ces deux réactions consécutives forment alors la réaction de Haber-Weiss (**figure 5**).

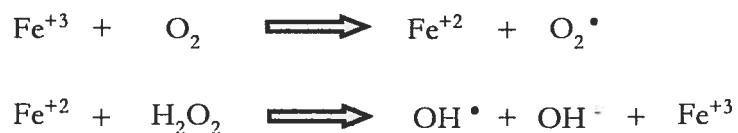


Figure 5 : Réaction de Haber-Weiss

1.3.2 Antioxydant

Un antioxydant est défini comme étant un réducteur ou un donneur d'électron (Halliwell, 1996). L'organisme possède plusieurs mécanismes de défense antioxydante dans ses fluides intra- et extracellulaires impliquant plusieurs enzymes telles que la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase (GPx) ainsi que la glutathion réductase (GR) (Halliwell et al, 1990). Il y a aussi d'autres molécules comme les vitamines C, E et le glutathion qui ont la capacité d'arrêter la propagation de la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique, mais également la capacité de protéger les protéines et l'ADN contre les attaques radicalaires. Ces molécules et ces systèmes antioxydants agissent par synergie et même par complémentarité. Le cas du recyclage du tocophérol en est un bon exemple (**figure 3**) (Halliwell et al, 1990).

1.3.2.1 Glutathion

Le glutathion est l'antioxydant par excellence *in vivo*. Sa particularité est d'être un antiperoxyde. Dans l'organisme, outre le glutathion, il y a d'autres molécules antiperoxydes dont la catalase dans les peroxysomes et la glutarédoxine dans les noyaux. Le glutathion,

tripeptide ubiquitaire, est retrouvé en plus grande concentration que ces deux autres antiperoxydes cités ci-dessus, dans l'ordre du mM au niveau intracellulaire alors qu'au niveau extracellulaire, il est de l'ordre du μM (Meister et al, 1983; Meister, 1984, 1988). Le glutathion joue un rôle important dans le métabolisme et la protection cellulaire contre les molécules oxydantes qui induisent des injures oxydantes. Étant un bon réducteur, le glutathion donne un électron par l'entremise de la GPx et devient alors radicalaire (GS^\bullet), mais rapidement, il réagira avec un autre GS^\bullet formant ainsi le glutathion dissulfure non radicalaire (GSSG). Le système du glutathion présent dans la matrice cellulaire réduit en H_2O les peroxydes générés dans les solutions de NP. Il a également la capacité de régénérer la vitamine C et E. Cet antioxydant constitue le sujet principal de ce mémoire, la section 1.4.2 est entièrement consacrée à sa formation ainsi qu'à son rôle d'antioxydant assumé dans l'organisme. Le glutathion oxydé a aussi la forme GS-X lorsqu'il détoxifie d'autres substances que les peroxydes, c'est le cas des xénobiotiques. Cependant, dans ce présent mémoire, la notion de glutathion oxydé se rapportera exclusivement au glutathion dissulfure, soit le GSSG.

1.4 STRESS OXYDANT ET MARQUEURS D'IDENTIFICATION

1.4.1 *Stress oxydant*

L'organisme vivant est constitué de mécanismes permettant l'équilibre entre les oxydants et les antioxydants. Toutefois, lorsqu'un déséquilibre survient en faveur des oxydants cela indique un stress oxydant. Le H_2O_2 généré dans les solutions de NP a le potentiel de causer un stress oxydant aux enfants prématurés puisque le niveau de glutathion est bas dans les cellules d'aspira endotracheal humain et corrélé avec l'âge de gestation (Lavoie et al, 1997 (a)). Le niveau de glutathion étant bas les prématurés sont plus susceptibles à un stress oxydant. De plus, Laborie et coll. ont montré la présence de H_2O_2 dans l'urine d'enfants recevant une NP non protégée de la lumière (Laborie et al, 2000 (a), 2002), confirmant l'immaturation de leur défense antioxydante à éliminer les peroxydes infusés lors de la NP.

Le stress oxydant peut être identifié par différents marqueurs. Lorsque le H_2O_2 forme le OH^\bullet à partir de la réaction de Fenton ou encore par la réaction de Haber-Weiss, ce radical peut à son tour attaquer des acides gras polyinsaturés et provoquer une peroxydation lipidique. La peroxydation lipidique enclenchée formera des produits de dégradation qui peuvent être mesurés pour déterminer s'il y a eu injure et stress oxydant. Le H_2O_2 peut aussi être éliminé par le système du glutathion. Les deux différentes formes du glutathion réduite (GSH) et dissulfure (oxydé, GSSG) peuvent également être mesurées pour vérifier la présence d'un stress oxydant.

D'autres marqueurs du stress oxydant provenant de protéines, tels que les carbonyles, ou de l'ADN, tel le 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG), existent aussi. Cependant, l'abondance des acides gras polyinsaturés dans l'organisme sont des cibles premières d'une attaque radicalaire due à leur richesse en électrons sur les doubles liaisons, favorisant alors la recherche de marqueurs dérivant d'une peroxydation lipidique.

1.4.1 Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique (**figure 6**) est décrite comme une réaction en chaîne comprenant trois étapes consécutives : l'initiation, la propagation et la terminaison (Gutteridge et al, 1990 ; Girotti, 1985, 1998). L'initiation débute par l'attaque d'une espèce chimique tel qu'un OH^\bullet . Ce radical a une réactivité suffisante pour arracher un électron à un acide gras polyinsaturé (LH). Il arrache un électron au carbone où les liaisons covalentes sont les plus stables (**figure 6**). De ce fait, le LH devient acide gras radicalaire (L^\bullet) puisqu'il y a perte d'un électron. Par le fait même, il y a un réarrangement électronique pour former un diène conjugué. Le diène conjugué radicalaire, réagit avec une molécule d'oxygène (O_2) pour former le nouveau radical hydroperoxyde (LOO^\bullet). Ce dernier, par attraction, attire un électron d'un autre d'acide gras et génère ainsi un lipide hydroperoxydé ($LOOH$) et un nouvel acide gras radicalaire (L^\bullet). Cette étape complétée, le L^\bullet nouvellement formé continuera le cycle de la peroxydation lipidique. La propagation de la réaction en chaîne

dépend de nombreux facteurs par exemple du ratio lipides/protéines dans la membrane, la composition en acides gras et la concentration en oxygène (Gutteridge et al, 1990).

Cette peroxydation en chaîne (ou cycle) sera terminée lorsqu'il y aura eu : 1) épuisement du substrat, 2) combinaison entre deux radicaux libres ou 3) par l'action de molécules antioxydantes situées entre autres, dans la membrane tel le tocophérol (Gutteridge et al, 1990; Girotti, 1985, 1998 ; Pironi et al, 1998; Manuel-y-Keenoy et al, 2002; Huang et al, 2002; Massarenti et al, 2004) (**figure 7**). Néanmoins, la molécule antioxydante oxydée devra être réduite à son tour.

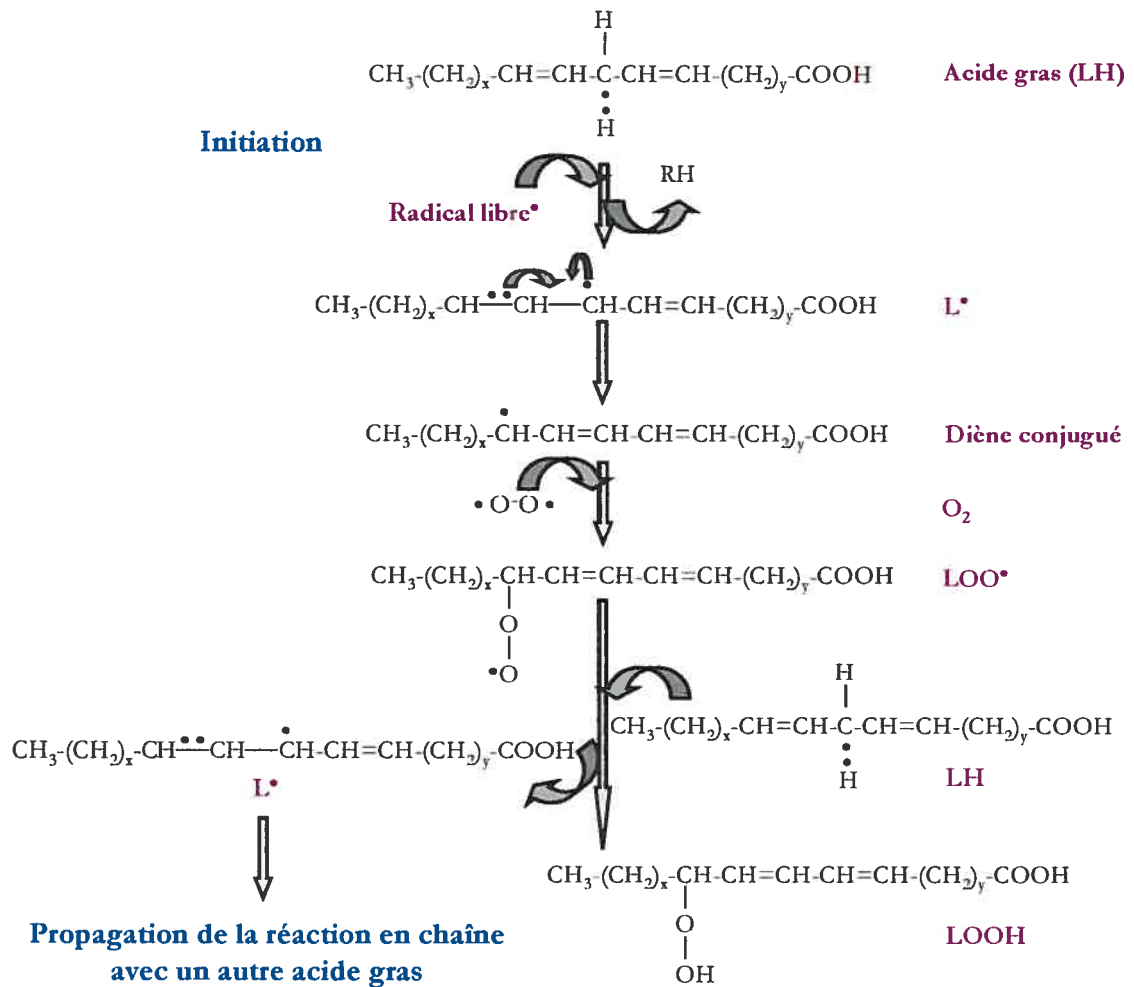


Figure 6 : Schéma de la peroxydation lipidique. OH^\bullet : radical hydroxyle, LH : acide gras polyinsaturé, L^\bullet : acide gras radicalaire, LOO^\bullet : radical hydroperoxyde, LOOH : lipide hydroperoxydé, O_2 : molécule d'oxygène.

Terminaisons possibles du cycle

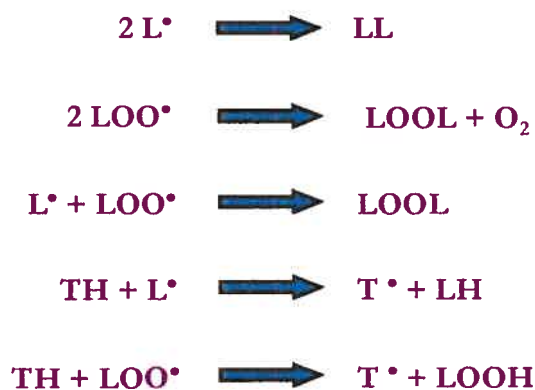


Figure 7 : Terminaisons possibles de la peroxydation lipidique. OH^{\bullet} : radical hydroxyle, LH : acide gras polyinsaturé, L^{\bullet} : acide gras radicalaire, LOO^{\bullet} : radical hydroperoxyde, LOOH : lipide hydroperoxydé, TH : tocophérol. Adapté de Girotti, 1985.

1.4.1.1 Marqueurs de la peroxydation lipidique

Les lipides peroxydés sont des espèces qui ont tendance à se décomposer de façon enzymatique ou non-enzymatique pour donner des produits de dégradation. Ceux-ci (**figure 8**) peuvent être détectés et évalués par différents moyens. Les aldéhydes (malonaldéhyde ou 4-hydroxynonéol), les isoprostanes (8-isoprostane F_{2a}), les alcanes (éthane et pentane) et les diènes conjugués sont des marqueurs de la peroxydation lipidique. Bien entendu, ces marqueurs de la peroxydation lipidique sont, en fait, peut être plus des marqueurs de la capacité réactionnelle du système lipidique puisqu'ils découlent de réactions de la peroxydation et forment les produits de la peroxydation. Toutefois, la littérature les identifie comme des marqueurs de la peroxydation lipidique. Ces différents produits de dégradation peuvent constituer des indices de stress oxydant donc du dépassement dans la capacité antioxydante cellulaire. Les alcanes sont des produits de dégradation très volatils ce qui les rend difficiles à détecter. Les aldéhydes sont couramment utilisés comme indice de la peroxydation lipidique, mais les techniques utilisées sont limitantes, les raisons seront reprises ci-dessous. Les diènes conjugués sont aussi utilisés comme marqueurs. Ils peuvent

être détectés par spectroscopie ou chromatographie liquide à haute performance (Moore et al, 1998). Cependant, les isoprostanes ont été favorisés aux diènes conjugués puisque c'est un marqueur fiable et reproductible couramment utilisé dans notre laboratoire.

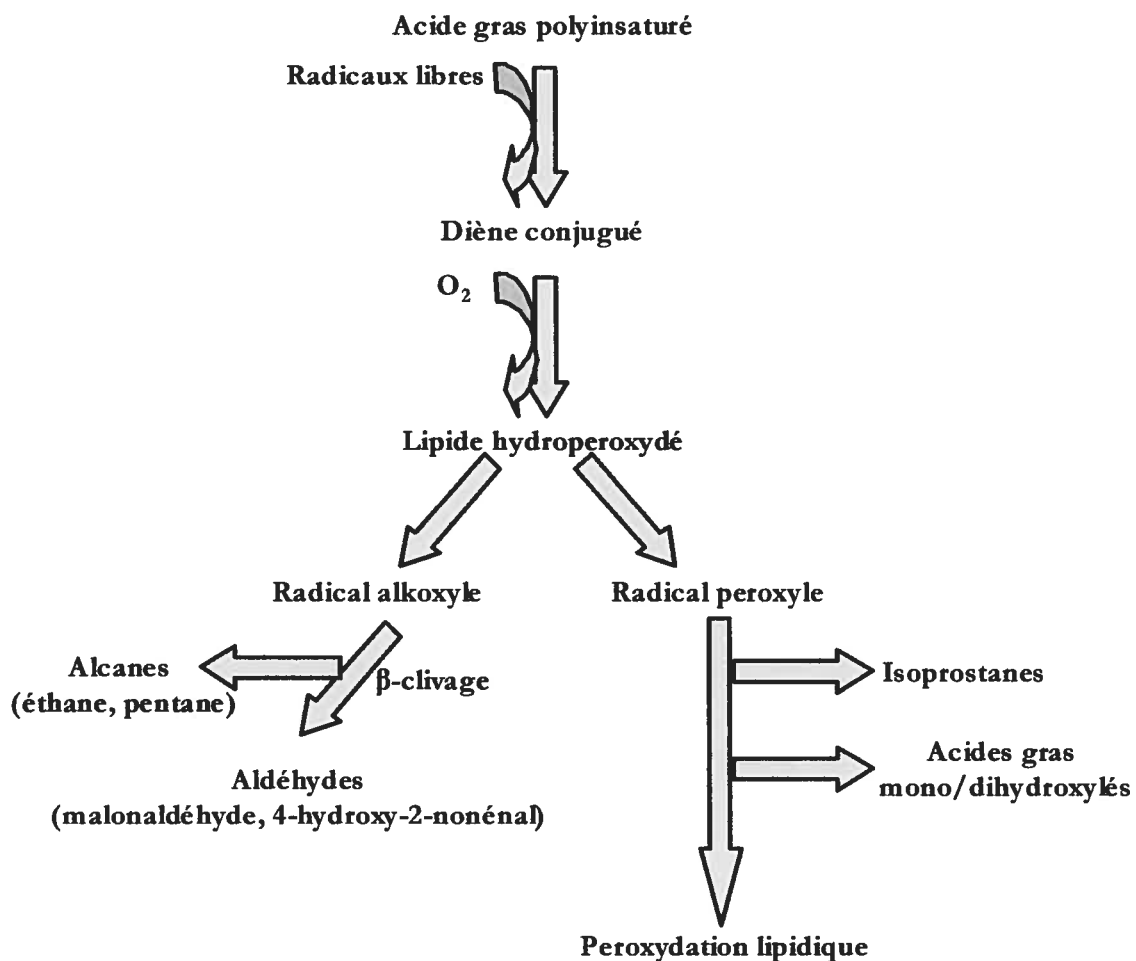


Figure 8 : Produits de dégradation issus de la peroxydation lipidique. Adaptée de Moore et al, 1998.

Le malonaldéhyde (MDA) est dérivé du lipide hydroperoxylé transformé en radical alkoyle et ayant subi un clivage en position β (**figure 8**) (Esterbauer et al, 1991). Il provient de lipides contenant des acides gras polyinsaturés avec au moins trois méthyles interrompus par des doubles liens, principalement les acides gras 20:4 et 22:6 (Esterbauer et

al, 1991). Le MDA peut être oxydé et métabolisé en dioxyde de carbone (CO₂) et en eau comme produits finaux dans le foie (Esterbauer et al, 1991). Ceci est un procédé mitochondrial puisque l'aldéhyde déshydrogénase convertit premièrement le MDA en acide malonique semi-aldéhyde, lequel, spontanément, se décarboxyle en acétaldéhyde. Ce dernier est ensuite, oxydé par l'aldéhyde déshydrogénase en acétate, donnant lieu aux produits finaux (Esterbauer et al, 1991). Le MDA pouvant être dégradé, une méfiance est de mise pour son utilisation comme marqueur de la peroxydation lipidique, puisqu'il peut être sous évalué.

Une technique habituellement utilisée pour évaluer la peroxydation lipidique est le dosage des MDA par conjugaison avec l'acide thiobarbiturique (TBA) qui, sous condition acide, forme un chromogène de couleur rose lequel est détecté à 532 nm (Gutteridge et al, 1990). Le produit mesuré est nommé "substance réagissant avec l'acide thiobarbiturique" (TBARS). Cette méthode est plus ou moins spécifique lorsqu'elle est utilisée pour des fluides biologiques, car l'acide thiobarbiturique réagit avec d'autres substances pour former des TBARS. De plus, il se peut que d'autres molécules de MDA soient générées lors des manipulations au cours du dosage, possiblement dues à la décomposition des lipides peroxydés. Il faut donc s'assurer que les TBARS mesurés proviennent du MDA et non de d'autres substances. Ceci est possible en isolant la molécule MDA-TBA formée par chromatographie liquide à haute performance (Lepage et al, 1991). Alors, le test des TBARS peut être utilisé pour vérifier la peroxydation lipidique ou la susceptibilité à la peroxydation dans un système *in vitro*, mais il est moins spécifique lorsque appliqué à des systèmes physiologiques complexes, que ce soit dans un milieu *in vitro* ou *in vivo*. Pour ces différentes raisons cet indice de peroxydation lipidique et de stress oxydant n'a pas été retenu pour ce projet de maîtrise.

Le 4-hydroxynonéal (HNE) est un aldéhyde qui fait partie de la famille des 4-hydroxyalkénal. Le HNE est le plus actif de la famille (Benedetti et al, 1980). À faible concentration, il agit comme un intermédiaire du métabolisme normal de la cellule, tandis qu'à haute concentration, il se lie à des protéines et perturbe les fonctions normales de la cellule. Le principal mécanisme menant à la formation des aldéhydes est la réaction de β -clivage de l'hydroperoxyde lipidique ou plus précisément du radical RO[•] (**figure 8**). Ce

sont les acides gras polyinsaturés (oméga 6) tels que 18:2 et 20:4 qui sont les plus susceptibles d'être transformés en HNE (Esterbauer et al, 1991).

Le HNE est une molécule qui a différents effets. Il peut réagir avec des sites nucléophiles de l'ADN, des protéines, ou encore avec des éléments intracellulaires (Esterbauer et al, 1991). *In vivo*, le HNE peut être conjugué au GSH spontanément ou par l'entremise de la glutathion S-transférase. Il est catabolisé en acide marcapturique et excrété dans l'urine (Esterbauer et al, 1991). Liu et coll. ont démontré que l'addition d'une source exogène de HNE réduit rapidement les niveaux cellulaires de GSH (Liu et al, 2000).

Des techniques couramment utilisées pour la détermination de cet aldéhyde sont la chromatographie liquide à haute performance et la chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (Moore et al, 1998). L'utilisation de ces méthodes est complexe. De plus, le dosage du HNE libre est douteux, car il se conjugue facilement avec d'autres substances. Cet aldéhyde n'a donc pas été choisi comme marqueur de peroxydation lipidique de ce projet.

Le 8-isoprostane F_{2α} (8-iso-PGF_{2α}), membre de la famille des isoprostanes, est produit par l'action des ROS sur l'acide arachidonique présente dans les membranes cellulaires (**figure 8**) (Lui et al, 1998 ; Morrow et al, 1997 ; Praticò, 1999 ; Praticò et al, 2001 ; Roberts et al, 2000). Ce métabolite est libéré par un mécanisme phospholipase-dépendant (Cracowski et al, 2000). Toutefois, l'acide arachidonique peut subir des réactions enzymatiques par les cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) pour former l'analogie isomérique aux isoprostanes, les prostaglandines (Liu et al, 1998 ; Praticò, 1999 ; Pratico et al, 2001 ; Robert et al, 2000). La caractéristique qui différencie un isoprostane d'une prostaglandine, est un cycle à cinq carbones avec les deux chaînes latérales en isomérisation *cis* (Cracowski et al, 2000). Cela signifie que les deux chaînes carbonées sont orientées du même côté par rapport au plan du cycle.

Le 8-isoprostane F_{2α} est retrouvé dans les tissus et les fluides biologiques. Il est stable, spécifique aux radicaux libres qui ont induit la peroxydation lipidique et est un marqueur sensible du dommage oxydatif lipidique (Morrow et al, 1997 ; Roberts et al,

2000). Ce produit de dégradation de la peroxydation lipidique peut être détecté par chromatographie gazeuse couplée à un spectre de masse d'ionisation chimique négative. Même si cette méthode est précise et exacte elle est très laborieuse et nécessite un appareillage qui n'est pas toujours disponible (Morrow et al, 1997 ; Moore et al, 1998). Toutefois, il existe une autre technique fiable qui est un dosage immunologique (ELISA). Cependant, il faut s'assurer de travailler avec la trousse ELISA appropriée pour les tissus visés puisqu'il en existe plusieurs sur le marché. Ce dosage est fréquemment utilisé dans notre laboratoire (Chessex et al, 2002) et est préféré au dosage des deux précédents aldéhydes dû à sa simplicité, sa fiabilité et sa disponibilité.

Un autre moyen existe afin de déterminer ou corroborer une injure oxydante. Il s'agit de déterminer la concentration, le statut et le potentiel redox du glutathion.

1.4.2 *Glutathion (L- γ -glutamyl-L-cystéinyglycine)*

Généralement appelé glutathion, le L- γ -glutamyl-L-cystéinyglycine (**figure 9**) est un tripeptide ubiquitaire non protéique. Le lien peptidique γ -glutamyle entre l'acide glutamique et la cystéinyglycine est résistant aux dégradations par des peptidases cellulaires (Sies, 1999) et lui confère la stabilité intracellulaire alors que son groupement thiol (SH) est requis pour son activité (Sies, 1999 ; Lu, 1999). Il est synthétisé dans les cellules par l'action de deux enzymes : γ -glutamylcystéine synthétase et glutathion synthétase. Cet antioxydant, de faible poids moléculaire (307 daltons), se retrouve au niveau intracellulaire à des concentrations mM (1 à 10 mM) chez presque tous les mammifères (Meister et al, 1983). La concentration plasmatique est de l'ordre du μ M (15 à 35 μ M) (Meister, 1984). Il peut exister sous deux formes distinctes, réduite (GSH) ou oxydée (glutathion dissulfure : GSSG). C'est la forme réduite du glutathion qui est retrouvée en plus grande concentration, représentant 90 % du glutathion au niveau tissulaire.

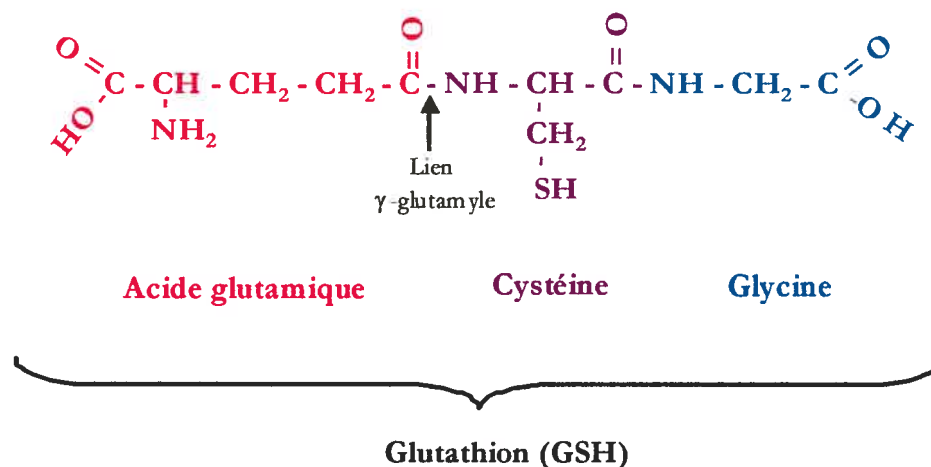


Figure 9 : Structure du glutathion avec ses différents acides aminés : acide glutamique, cystéine, glycine.

Le glutathion est impliqué de manière directe ou indirecte dans une très grande variété de fonctions physiologiques incluant : 1) la détoxification des électrophiles (détoxification des xénobiotiques ou de leurs métabolites, spontanément ou par la glutathion S-transférase) (Meister et al, 1983), 2) le maintien du statut redox des protéines thiolées pour prévenir l'oxydation du groupement thiol ou pour réduire les liens dissulfures, 3) sert de transporteur et de réservoir pour la cystéine (Griffith, 1999 ; Lu, 1999 ; White et al, 1994), 4) la modulation des processus cellulaires critiques tels que la synthèse d'ADN, des procédés reliés aux microtubules et des fonctions immunes et 5) cofacteur de plusieurs enzymes (GPx, GR, PGE₂ isomérase, PGF_{2α} réductase etc.) (Garcia-Alfonso et al, 1993 ; Imai et al, 2003), 6) antioxydant dont le rôle antiperoxyde par l'entremise de la glutathion peroxydase et éboueur des radicaux libres (Gilbert et al, 1990 ; Meister et al, 1983). Dans ce mémoire c'est l'aspect antioxydant et antiperoxyde du glutathion qui est étudié.

1.4.2.1 Métabolisme du glutathion

Le métabolisme du glutathion est nommé cycle γ -glutamyle (**Figure 10**) (Meister et al, 1983; Meister A, 1984, 1994 (b)). Le glutathion constitue entre autres une voie de transport des acides aminés vers l'intérieur de la cellule. Les acides aminés les plus utilisés pour ce type de transport sont la cystéine et le glutamate, mais d'autres acides aminés neutres peuvent aussi y participer (Meister A et Anderson ME, 1983). La γ -glutamyltranspeptidase, une glycoprotéine ancrée à la surface membranaire externe, transfère le groupement γ -glutamyle du glutathion à un autre acide aminé accepteur (Meister A et Anderson ME, 1983 ; Meister A, 1984) pour former le γ -glutamyl-acide aminé. Le γ -glutamyl-acide aminé et la cystéinylglycine restante, sont transportés dans la cellule pour participer à la synthèse *de novo* du glutathion. Dans la cellule, le γ -glutamyl-acide aminé est le substrat de l'enzyme γ -glutamylcyclotransférase, qui coupe le lien γ -glutamyle, libérant l'acide aminé et convertissant le γ -glutamyle en 5-oxo-L-proline. La prochaine étape requiert de l'énergie (ATP) et l'enzyme 5-oxo-prolinase pour que le 5-oxo-L-proline soit converti en L-glutamate, un des acides aminés constituant le glutathion. La cystéinylglycine formée par l'action de la transpeptidase est clivée de nouveau par une dipeptidase soit en L-cystéine et en glycine. Le glutathion peut alors être synthétisé de nouveau à l'intérieur de la cellule. Le L-glutamate et le L-cystéine avec l'enzyme γ -glutamylcystéine synthétase forme la première étape pour produire le dipeptide γ -glutamylcystéine. Ce dernier servira de co-substrat avec la glycine pour l'enzyme glutathion synthétase afin de former l'étape finale du glutathion. Ces deux étapes requièrent aussi de l'énergie. Le glutathion a une action rétro-inhibitrice sur l'enzyme γ -glutamylcystéine synthétase lorsque présent en grande concentration. Ces réactions constituent le cycle du γ -glutamyle. Ce cycle est important puisque le glutathion ne traverse pas librement la membrane cellulaire. C'est ainsi que le glutathion plasmatique, provenant du foie, peut enrichir les tissus environnants.

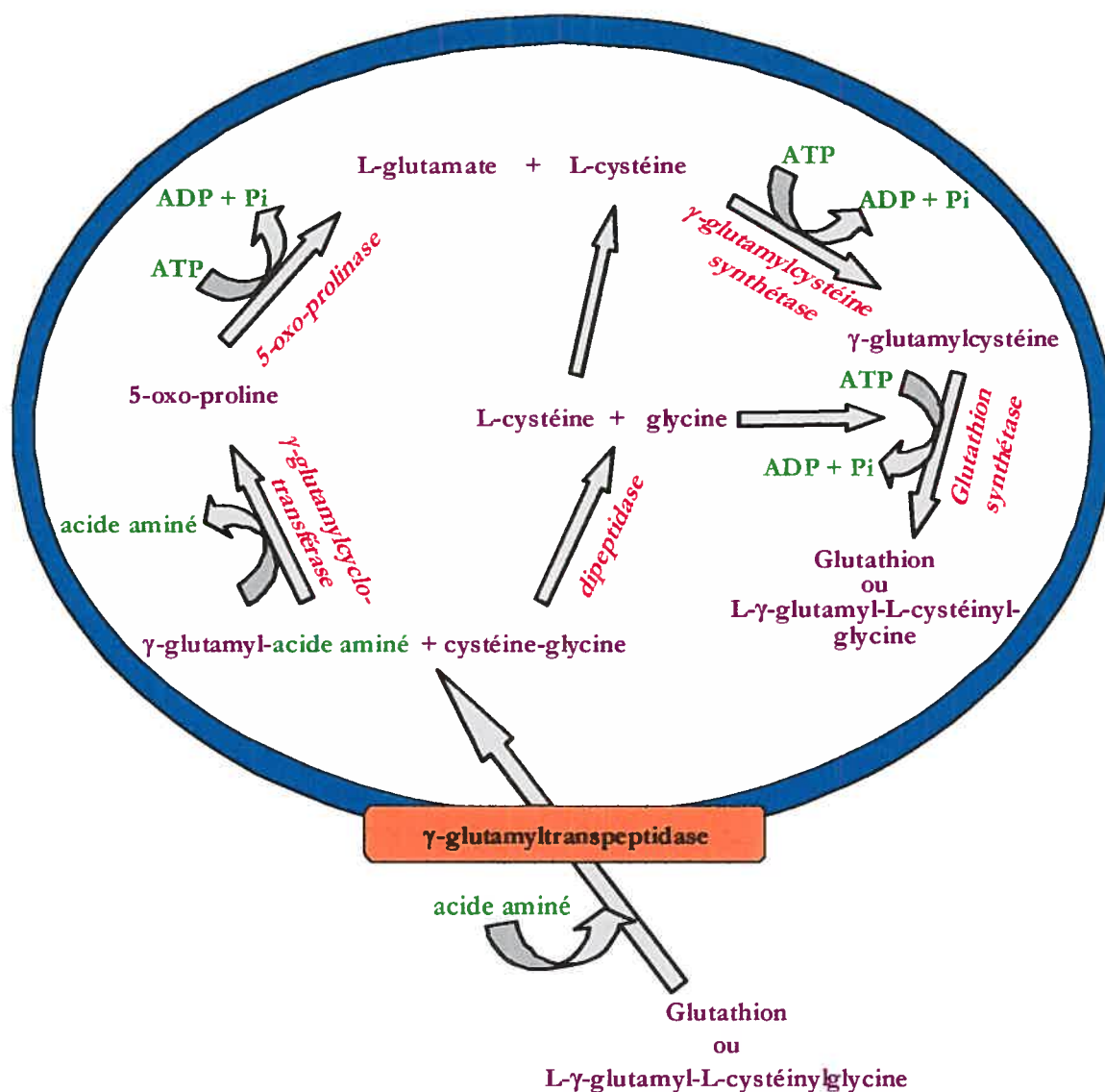


Figure 10 : Cycle γ -glutamyle

La cystéine est le substrat limitant dans la synthèse du glutathion, car sa concentration cellulaire normale est au niveau du K_m ($K_m \approx 0,2$ à $0,35$ mM) (Griffith, 1999 ; Huang et al, 1993 ; Meister et al, 1983 ; Meister, 1984 ; Shi et al, 1994 ; White et al, 1994) alors que l'acide glutamique ($K_m \approx 1,7$ mM) (Griffith, 1999) ne l'est pas, car il est présent en concentration bien au-delà du K_m de l'enzyme γ -glutamylcystéine synthétase. Le niveau cellulaire du glutathion est alors limité par l'activité de la γ -glutamylcystéine synthétase.

Le glutathion synthétisé dans la cellule se trouve à 90% dans le cytoplasme alors que la quantité restante va être entre autres transportée dans la mitochondrie puisque cette organelle est incapable de le synthétiser (White et al, 1994). Toutes les cellules sont capables de synthétiser le glutathion, mais le foie joue un rôle primordial en leur fournissant le substrat soit le groupement γ -glutamyle du glutathion (White et al, 1994). Le glutathion peut être transporté au niveau plasmatique ou excrété dans la bile. Lorsque le glutathion est en circulation au niveau plasmatique, il peut servir à nouveau, à la synthèse du glutathion dans les cellules d'organes possédant la γ -glutamyltranspeptidase comme l'endothélium et le rein (Kaplowits et al, 1996 ; White et al, 1994).

1.4.2.2 Enzymes impliquées dans le cycle redox du glutathion

Ayant des propriétés facilement réductrices en raison de sa fonction thiol, le glutathion réduit les peroxydes endogènes et exogènes en alcool à l'aide de la glutathion peroxydase (GPx) (**figure 11**). Parallèlement, la cellule utilise une autre enzyme nommée glutathion réductase (GR) (**figure 11**) pour maintenir le niveau intracellulaire du GSH. Le glutathion peut aussi interagir avec l'enzyme glutathion S-transférase. L'action de la glutathion S-transférase peut provoquer une perte du glutathion libre donc cela peut influencer le statut et potentiel redox (voir la section 1.4.2.3). Éventuellement, si les résultats de ce projet indiquaient que la concentration en glutathion est modifiée, il serait intéressant de voir les causes de cette modification et dans ce cadre, étudier la glutathion S-transférase.

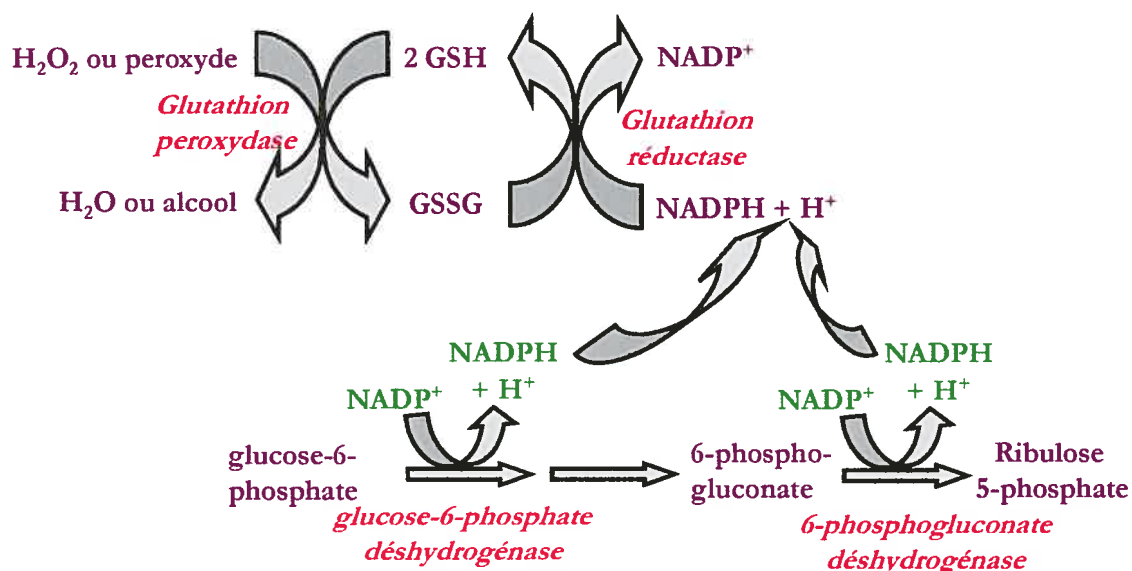


Figure 11 : Oxydation du glutathion par la glutathion peroxydase ainsi que son recyclage par la glutathion réductase impliquant la voie des pentoses phosphates.

La GPx (**figure 11**) catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène et de plusieurs peroxydes organiques, incluant les acides gras hydroperoxydés, en une molécule d'alcool correspondante (Imai et al, 2003 ; Meister, 1988). Son action nécessite la présence du GSH, lequel subira une oxydation (Meister, 1988). Le GSH transfère alors un électron pour devenir radicalaire (GS^\bullet) et, rapidement, il réagira avec une autre molécule de glutathion radicalaire pour former ainsi, le GSSG. La glutathion peroxydase est l'enzyme clé de la détoxification des peroxydes. Par le fait même, elle protège la membrane de la peroxydation lipidique.

La forme oxydée du glutathion peut provoquer un déséquilibre du statut redox cellulaire. Ce ratio oxydé/réduit (GSSG/GSH) modifié aura un impact considérable sur l'état d'activité ou d'inactivité des protéines par exemple; les protéines tyrosines phosphatases (Meng et al, 2002 ; Monteiro et al, 1996 ; Sen, 2000 ; Xu et al, 2002). La cellule se doit de maintenir son statut redox dans un état d'équilibre. Pour ce faire, elle doit augmenter sa concentration du glutathion sous la forme réduite ou alors exporter la forme oxydée, ce qui nécessite une dépense énergétique. C'est alors qu'intervient l'enzyme GR qui a la capacité de recycler le GSSG en GSH. Cette réaction nécessite le NADPH comme co-facteur agissant

comme agent réducteur (Meister et al, 1983 ; Merister, 1988). Il est fourni en grande majorité par les enzymes glucose-6-phosphate déshydrogénase et 6-phosphogluconate déshydrogénase du cycle des pentoses phosphates (**figure 11**) (White et al, 1994). Il y a également d'autres sources enzymatiques dans la cellule qui fournit le NADPH. L'enzyme malique, faisant partie du système transporteur du citrate, forme du NADPH dans le cytosol. Il y a l'enzyme cytosolique isocitrate déshydrogénase qui utilise le NADP^+ et génère le NADPH de la synthèse des acides gras et du cholestérol. Dans la mitochondrie, l'isocitrate déshydrogénase, laquelle fait partie du cycle de l'acide citrique, produit du NADPH nécessaire à la GR (Reed, 1986).

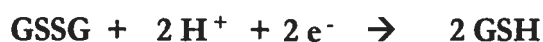
1.4.2.3 Statut et potentiel redox

L'équilibre entre le GSH et le GSSG fournit un indicateur dynamique du stress oxydant. Par conséquent, le statut redox du glutathion est défini comme étant le ratio GSSG/GSH. Ce ratio peut être influencé (Gilbert et al, 1990) par différents facteurs comme la concentration de peroxydes, la synthèse du GSH, l'exportation du GSH ou GSSG hors de la cellule ou encore la capacité du GSH à se lier à des protéines, les vitesses de réactions de la GPx et de la GR (Gilbert et al, 1990; Jones, 2002) ce qui fait du glutathion un bon marqueur du stress oxydant. Il existe d'autres couples redox (Jones, 2002 ; Huang et al, 1993 ; Schafer et al, 2001), par exemple : cystéine/cystine (concentration intracellulaire $\approx 0,25$ mM) (Shi et al, 1994), $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ (concentration intracellulaire ≈ 50 μM) (Worthington et al, 1974). Toutefois, parce que le couple redox du glutathion est de 20 à 100 fois plus abondant dans la cellule que les autres couples, la détermination du ratio GSSG/GSH est ainsi considérée comme un indicateur représentatif du statut redox cellulaire globale (Gilbert et al, 1990 ; Jones, 2002 ; Sies, 1999).

Afin d'estimer l'environnement redox cellulaire, il faut considérer : 1) la notion de stœchiométrie due au fait qu'il y a deux molécules de GSH par molécule de GSSG, et 2) la concentration de ces molécules (Jones, 2002 ; Schafer et al, 2001). Le potentiel redox ou réducteur (E_{hc}) peut être calculé pour donner une vue d'ensemble de l'environnement redox

cellulaire. Le E_{hc} est calculé en accord avec l'équation de Nernst (**figure 12**) puisque le potentiel fait référence aux forces électromotrices (Jones, 2002 ; Kirilin et al, 1999 ; Schafer et al, 2001). La valeur du potentiel redox donne une expression quantitative de la tendance du couple redox à accepter ou donner des électrons. La capacité réductrice du couple redox est exprimée par rapport à une électrode standard d'hydrogène (1 atm H_2 , 1 M H^+) au pH de l'environnement (pH=7,4 dans un environnement physiologique (Jones et al, 2000)) et est donnée en millivolts (mV) (Jones DP, 2002).

$$E_{hc} = E_o + \left[\frac{RT}{nF} \right] * \ln \left[\frac{Red}{Ox} \right]$$



$$E_{hc} = -240 + \left[29.55 \right] * \log_{10} \left[\frac{GSH^2}{GSSG} \right]$$

E_{hc} : Potentiel redox (mV)

E_o : Potentiel standard pour le couple redox GSH-GSSG (-240 mV à pH=7)

R : Constante des gaz ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

T : Température ($25^{\circ}\text{C} = 298.15 \text{ K}$)

n : Nombre d'électrons transférés (2 pour le couple GSH-GSSG)

F : Constante de Faraday ($9.6485 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$)

ln : Logarithme naturel (facteur de conversion de 2.303 pour \log_{10})

Red : Concentration M de la forme réduite (GSH)

Ox : Concentration M de la forme oxydé (GSSG)

Figure 12 : Équation de Nernst pour le calcul du potentiel redox du glutathion. Adaptée de Schafer et al, 2001.

Sous conditions normales dans la cellule, le E_{hc} pour le couple glutathion est relativement plus réducteur parce qu'il y a présence de la glutathion réductase alors que sous

conditions de stress oxydant où les niveaux de GSSG sont augmentés le E_{hc} devient plus oxydé (Kirlin et al, 1999). La concentration est importante, car il pourrait y avoir une différence de statut redox (ratio) mais un même potentiel redox. De plus, Kirlin a souligné que le potentiel redox est remarquablement similaire dans différents types cellulaires (Kirlin et al, 1999).

Le statut redox est critique pour une grande variété d'événements biologiques, par exemple la modulation de facteurs transcriptionnels comme le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) et la protéine activatrice 1 (AP-1) (Arrigo, 1999 ; Clive et al, 1996 ; Meyer et al, 1994 ; Sen, 2000 ; Sun et al, 1996). De plus, le statut redox est également régulateur de la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose et de la réaction inflammatoire (Hentze et al, 2003 ; Kirlin et al, 1999; Li et al, 2003 ; Rahman et al, 2000 ; Schafer et al, 2001).

Nous émettons l'hypothèse que la NP, par son contenu en molécules antioxydantes (vitamines C et E) et oxydantes (peroxyde d'hydrogène et hydroperoxydes lipidiques), module le statut et potentiel redox hépatique.

1.5 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE TRAVAIL

Bon nombre d'études ont démontré que les solutions de NP telles qu'administrées en clinique sont contaminées par des peroxydes surtout lorsqu'elles sont exposées à la lumière ambiante, et cela même si ces solutions nutritionnelles contiennent des multivitamines ayant des propriétés antioxydantes (vitamines C et E). De plus, il est connu que la NP est associée à des complications hépatiques telles que la cholestase observée chez l'enfant et la stéatose chez l'adulte. Un dénominateur commun pour plusieurs de ces études suggérant l'effet d'acides aminés, de lipides ou de multivitamines, est la génération de peroxydes dans les solutions de nutrition parentérale. Cette charge oxydante peut alors influencer le potentiel redox du glutathion hépatique.

L'**hypothèse** émise dans ce mémoire est que la nutrition parentérale influence le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique; et que les complications hépatiques reliées à la nutrition parentérale, cholestase et stéatose, sont associées à une modification de ce statut et ce potentiel.

Le **principal objectif** de ce projet d'étude est de vérifier l'association entre la nutrition parentérale et le statut, et le potentiel redox du glutathion hépatique. Les **objectifs spécifiques** sont :

1. la validation d'une méthode d'électrophorèse capillaire en solution libre afin de permettre la détermination simultanée du glutathion sous sa forme GSH et GSSG. Cette validation sera effectuée en vérifiant: 1) l'effet du kV; 2) la spécificité de l'électrophérogramme pour les formes GSH et GSSG du glutathion; 3) les coefficients de variation intra- et inter-essais des déterminations et des temps de rétention; 4) seuil de détection; 5) stabilité à - 80 °C et 6) la comparaison entre la concentration totale en glutathion retrouvée sur l'électrophorèse capillaire en solution libre et celle déterminée à l'aide d'un dosage enzymatique.
2. Suite à la validation de la méthode utilisée pour déterminer le statut et le potentiel redox du glutathion, quatre protocoles expérimentaux *in vivo* seront effectués.

- 2.1. *Mesurer l'impact des différentes composantes de la nutrition parentérale sur le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique.* Pour ce faire, la concentration en GSH et GSSG seront déterminées dans les foies de cochons d'Inde nouveau-nés ayant reçu différentes solutions intraveineuses composées soit de dextrose, de multivitamines, d'acides aminés ou de lipides exposées ou non à la lumière ambiante. Afin d'expliquer les résultats, l'activité de la glutathion réductase, la concentration de la 8-isoprostane $F_{2\alpha}$ seront déterminées dans le foie ainsi que le statut et le potentiel redox du glutathion dans le globule rouge
- 2.2. *Quantifier l'influence du peroxyde d'hydrogène sur le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique.* Pour ce faire, la concentration en GSH et GSSG seront déterminées dans les foies de cochons d'Inde nouveau-nés ayant reçu des solutions intraveineuses contenant différentes concentrations en peroxyde d'hydrogène.
- 2.3. *Vérifier l'influence antiradicalaire des multivitamines sur le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique.* Pour ce faire, la concentration en GSH et GSSG seront déterminées dans les foies de cochons d'Inde nouveau-nés ayant reçu différentes solutions intraveineuses constituées soit de dextrose, de multivitamines, ou de peroxyde d'hydrogène. Afin d'expliquer les résultats, l'activité de la glutathion réductase sera déterminée au foie.
- 2.4. *Comparer le statut redox du glutathion hépatique d'animaux avec ou non une cholestase ou une stéatose induite par la nutrition parentérale.* Pour ce faire, le statut redox sera mesuré, la cholestase sera évaluée par le débit biliaire et la stéatose quant à elle sera déterminée par évaluation histologique.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MATÉRIEL

Les manipulations expérimentales effectuées demandent plusieurs réactifs et appareils alors, pour alléger le texte voici une liste des compagnies distributrices du matériel :

American Chemicals, Montréal, Qc, Canada : hydroxyde de sodium (NaOH);

Beckman Co, Fullerton, CA, USA : électrophorèse Capillaire (P/ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis system), spectrophotomètre (DU 640);

Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada : dosage protéique Bio Rad;

Baxter, Mississauga, ON, Canada : travasol 10% : acides aminés;

Boehringer Mannheim GmbH, Laval, Qc, Canada : acide acétique tétra-éthylènedinitrilo disodique (EDTA-Na₂), TRIS hydroxyméthyl)aminiméthane (TRIS base), TRIS hydrochlorure (TRIS HCl), albumine de sérum bovin (BSA);

Bayer, Toronto, ON, Canada : Xylamine;

Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA : ELISA pour isoprostane F_{2α};

Charles River St-Constant, Montréal, Québec, Canada : cochon d'Inde;

Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA : 2(bis(2-hydroxyéthyl)imino)-2-(hydroxyméthyl)-1,3 propanediol (Bis-TRIS), phosphate de sodium monobasique (NaH₂PO₄·H₂O), eau de qualité HPLC (H₂O HPLC), acétate d'éthyle, acide sulfurique (H₂SO₄), peroxyde d'hydrogène (H₂O₂);

JT Baker Chemical Co, Phillipsburg NJ, USA : acide borique;

Luther Medical Product, Tustin, CA, USA : cathéter de polyuréthane;

Pharmacia Upjohn, Baie D'Urfé, Qc, Canada : Intralipid 20 % : lipides(Lip);

Produits Chimiques ACP, Montréal, Qc, Canada : méthanol;

Sabex, Boncherville, Qc, Canada : multi-12 pédiatrique : multivitamines (MV), Kétamine;

Sigma-Aldrich Co, St-Louis, MO, US : acide métaphosphorique (MPA), borate de sodium, acide sulfosalicylique (ASS), L-sérine, phosphate de sodium dibasique (Na₂HPO₄), acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) (DTNB), o-cresilsulfonphthalein-3',3''-bis-(méthyliminodiacétate de sodium) (xylénol orange), méta-bisulfite de sodium (Na₂S₂O₅), chlorure ferreux (FeCl₂), hydroxytoluène butylé (2,6-di-ter-butyl-4-methylphenol) (BHT), tert-butyl hydroperoxyde (TBH);

Roche Diagnostique, Montréal, Qc, Canada : glutathion réduit (GSH), glutathion oxydé (GSSG), glutathion réductase (GR), nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH);
Waters, Milford, Massachusetts, USA: Sep-Pak®Vac RC (colonne C₁₈).

2.2 ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

2.2.1 Préparation de l'échantillon

Une solution fraîche d'acide métaphosphorique (MPA) 5 % (p/v) est préparée avec de l'eau de qualité HPLC avant le sacrifice des animaux. Dès le prélèvement des échantillons, l'expérimentateur dispose d'une période d'environ six minutes pour la préparation et la congélation des échantillons. Lors du sacrifice, une ponction artérielle est effectuée dans l'artère abdominale du cochon d'inde afin de prélever le sang, lequel est transféré dans un tube de prélèvement sanguin contenant du K₃EDTA liquide. Un ml de sang est immédiatement centrifugé quatre min à 5 500 g pour séparer les érythrocytes du plasma. 150 µL de globules rouges sont additionnés à 450 µL de MPA 5 % (dilution ¼), le tout est mélangé et centrifugé à 5 500 g pour une minute. Le surnageant est gardé et congelé à - 80 °C jusqu'à l'analyse.

L'échantillon hépatique est préparé de manière similaire aux érythrocytes et cette préparation doit aussi être effectuée dans un temps maximal de quatre minutes. Une fraction du foie (0,5 g) est prélevée et est homogénéisée dans 2,5 ml de la solution de MPA 5 % (dilution de 1/6) sur glace pour une période de deux fois 30 sec (pause de 10) ce qui permet la précipitation des protéines. L'homogénat est centrifugé pour une période de trois minutes à 5 500 g. Le surnageant est prélevé et conservé à - 80 °C jusqu'à l'analyse. Le temps de conservation des échantillons au congélateur (- 80 °C) a été vérifié.

Pour la détermination du GSH et GSSG par l'électrophorèse capillaire en solution libre, les échantillons de foie et de globules rouges sont dégelés sur glace. Une seconde dilution (1/5) est effectuée avec de l'eau HPLC pour les échantillons d'érythrocytes et

hépatiques afin d'abaisser la conductivité de l'échantillon par rapport à celle du tampon. Ceci permet de compacter l'échantillon en une petite zone dans le capillaire lors de la séparation. Les échantillons sont alors prêts à être injectés et analysés sur électrophorèse capillaire.

La concentration totale en glutathion (GSH + (2 x GSSG)) qui tient compte de la forme réduite et oxydée s'exprime en équivalent de GSH, d'où le fait de multiplier par deux la concentration de GSSG. Le statut redox correspond au ratio des concentrations suivantes $GSSG/(GSH+(2 \times GSSG)) \times 100$. Le potentiel redox est calculé à partir de l'équation de Nernst et à l'aide des concentrations molaires de GSH et GSSG. Le volume de l'échantillon hépatique est calculé en utilisant le poids du foie et en estimant que la densité est égale à 1. Afin de calculer les concentrations molaires du GSH et GSSG des échantillons de globules rouges, le volume est estimé de la façon suivante. Un compte moyen (trois animaux) de globules rouges par ml ($1,04 \times 10^{10}$ cellules/ml), et un dosage de protéines (382 mg de protéines/ml), sont déterminés en utilisant respectivement un hématimètre et le kit de Bio Rad. Nous avons ainsi le nombre de mg de protéines par globule rouge ($2,68 \times 10^{-8}$ mg/globule rouge). À l'aide du volume moyen d'un érythrocyte ($86,1 \times 10^{-15}$ L) (Geigy Documenta, 1973), le volume moyen d'un mg de protéines est calculé ($2,34 \times 10^{-6}$ L). La concentration en glutathion totale ayant été déterminée par mg de protéines, cette estimation du volume/mg de protéines est appliquée à tous les échantillons afin de connaître la concentration molaire totale en glutathion des globules rouges.

2.2.2 Méthode

La détermination du glutathion (Surru et al, 2001) sous sa forme réduite (GSH) et oxydé (GSSG) est effectuée grâce à l'utilisation du P/ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis system de Beckman Coulter.

L'électrophorèse capillaire en solution libre est une technique de séparation électrocinétique dans un capillaire de faible diamètre où les solutés sont séparés au sein d'un flux d'électrolytes aqueux en fonction de leur charge. Le principe consiste à la séparation

d'espèces contenues dans un mélange selon leur migration différentielle sous l'influence d'un champ électrique. Ceci se produit grâce à deux phénomènes combinés : l'électromigration (migration des espèces chargées dans un milieu sous l'influence d'un champ électrique appliqué) et l'électro-osmose (flux d'électrolytes aqueux induit électriquement dans des capillaires de faible diamètre dû à la présence d'une double couche électrique à l'interface de la silice fondue et du tampon de séparation) (Blessum et al, 1999 ; Robert et al, 1991).

Le système d'électrophorèse capillaire est équipé d'un détecteur UV (200 nm) et du logiciel 32 Karat (version 5,0) de Beckman Coulter. La séparation est faite à l'aide d'un capillaire de silice fondue de 75 μm de diamètre interne par 57 cm de longueur totale. La longueur du capillaire jusqu'à la fenêtre de détection est de 50 cm. Le système de séparation est monté de manière à ce que l'anode soit située du côté gauche du détecteur pour l'injection. La température du capillaire est maintenue à 28 °C. Avant chaque utilisation de l'appareil, le capillaire est conditionné avec du méthanol, du HCl 1 N, du NaOH 0,1 N, du H₂O de qualité HPLC de manière consécutive, ceci permet la déprotonation à la surface de la silice fondue pour maintenir une reproductibilité optimale. La dernière étape du conditionnement consiste à effectuer une infusion avec du tampon (acide borique (75 mM) et bis-TRIS (25 mM), pH 8,4) pour une période de 10 minutes à une pression de 20 psi. Cette étape permet à la double couche électrique de se mettre en place pour permettre le phénomène d'électro-osmose. L'échantillon est introduit sous faible pression hydrodynamique (0,5 psi) pour une durée de 10 secondes ce qui correspond à environ une injection de 50 nL. Suite à cette étape, une petite quantité d'eau est aspirée pour que l'échantillon puisse se compacter dans une petite zone afin d'avoir une meilleure résolution dans la fenêtre de détection. L'électrophorèse est exécutée à voltage constant de 18 kV pour une période de 10 min. Entre chaque séparation, le capillaire est rincé avec du NaOH 0,1 N et de l'eau de qualité HPLC ainsi que du tampon de séparation pour permettre au capillaire de se remettre dans des conditions optimales pour la séparation de l'échantillon suivant. Les données sont acquises à quatre Hz et sont visualisées sous forme d'un électrophérogramme. Les concentrations de GSH et de GSSG contenues dans les échantillons de globules rouges et hépatiques sont quantifiées par comparaison aux courbes étalons de GSH (0 à 250 μM) et de GSSG (0 à 10 μM).

2.2.3 Optimisation de la méthode

Pour arriver à cette technique d'électrophorèse capillaire optimale le paramètre du voltage est étudié. Différents voltages (16-18-20-30 kV) sont vérifiés pour permettre une séparation nette des pics GSH et GSSG. La spécificité des pics de GSH et GSSG est vérifiée de deux manières : 1) par repérage en ajoutant du GSH et/ou GSSG à un échantillon comparatif et 2) en éliminant le pic recherché à l'aide de N-éthylmaleimide (NEM) pour le GSH et de dithiothréitol (DTT) pour le GSSG. La concentration de NEM doit être de 10 fois supérieure à celle de GSH et la concentration du DTT doit excéder de 100 fois celle du GSSG toutefois, l'ensemble de la solution GSSG et DTT doit être à pH légèrement basique. Les coefficients de variations (CV) inter-essai pour la pente et l'ordonnée à l'origine des courbes étalons ainsi que les CV intra (n = 4) et inter-essai (n = 10) du temps de rétention sont déterminés. Les CV (n = 10) intra et inter-essai de concentration et de temps de rétention pour un échantillon hépatique et de globules rouges sont déterminés. Les CV sont calculés à partir de la moyenne divisée par l'écartype et multipliée par 100. Les seuils de détection du GSH et GSSG sont déterminés à l'aide d'un intervalle de confiance de 95 % sur l'ordonnée à l'origine de 10 courbes étalons.

2.3 MÉTHODE DE DOSAGE ENZYMATIQUE DU GLUTATHION

Cette technique est utilisée afin de valider la concentration en glutathion total mesurée à l'aide de la méthode d'électrophorèse capillaire en solution libre.

Cette méthode utilise le principe de la cinétique enzymatique pour la détermination de la concentration totale du glutathion dans un échantillon hépatique. En présence de NADPH et de glutathion réductase, le GSSG présent dans l'homogénat est transformé en GSH et, ce dernier réduit l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB) ou réactif d'Ellman, en acide 5-thio(2-nitrobenzoïque) (TNB) absorbant à 412 nm (**figure 13**). En fait, c'est un cycle, le GSSG formé est à nouveau réduit par la glutathion réductase. Ainsi

l'augmentation de la densité optique n'est causée que par le GSH, due à la spécificité de la glutathion réductase pour le GSSG.

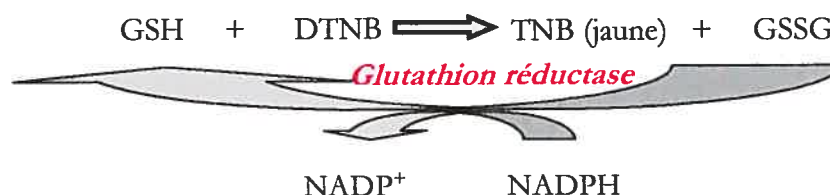


Figure 13 : Schéma explicatif du principe du dosage enzymatique du glutathion.

Un échantillon hépatique est prélevé et homogénéisé (1/9) dans un tampon TESB (TRIS-HCl 50 mM, EDTA-Na₂ 0,1 mM, L-sérine 10 mM, Borate-Na 20 mM, pH 7). Après une centrifugation d'une minute à 5 500 g, le surnageant (50 µL) est ajouté à 200 µL de TESB. Suite à cette étape, le nouveau mélange est divisé pour le dosage des protéines et la détermination du glutathion total. À la portion dédiée au dosage des protéines, du NaOH 1 N est ajouté afin de solubiliser les protéines. Le lendemain, le dosage des protéines est effectué à l'aide du réactif coloré de Bio Rad selon la méthode de Bradford et d'une courbe étalon composée de BSA. 50 µL de la portion dédiée au dosage du glutathion sont mis en présence d'acide sulfosalicylique (ASS 10 % p/v) pour précipiter les protéines, ce qui est en accord avec la méthode de Griffith (Griffith, 1980). L'échantillon est dilué 1/100 avec du TESB et est mis en présence de DTNB 0,6 mM et NADPH 0,2 mM. La réaction commence avec l'ajout de 20 µL de glutathion réductase (0,5 µg/ml) pour un volume final de 1 ml. L'absorbance est lue à 412 nm durant 8 minutes. La pente (absorbance vs temps) des quatre dernières minutes est calculée puisque le recyclage du GSSG est maintenant linéaire. La pente de l'échantillon analysé est comparée à celle de la courbe étalon faite de GSSG. Le GSSG est préféré au GSH, car il est déjà oxydé et que le GSH peut fausser les calculs en s'oxydant. Les résultats sont multipliés par un facteur de deux pour les exprimer en équivalent de GSH.

2.4 MODÈLE EXPÉRIMENTAL

Employé dans nos études antérieures (Chessex et al, 2001; Chessex et al, 2002), le modèle du cochon d'Inde est également utilisé dans le cadre de ce projet d'étude. Ce modèle animal est choisi, puisqu'il a l'avantage d'être la seule espèce avec les primates et l'humain ne pouvant pas synthétiser l'acide ascorbique (Bánhegyi et al, 1997). De plus, comparé au rat qui est communément utilisé comme modèle expérimental, le cochon d'Inde est rapporté être favorable pour étudier le métabolisme hépatique des acides aminés et du débit biliaire (Chaib et al, 2004). Par ailleurs, similairement au nouveau-né humain, le système du glutathion du cochon d'Inde nouveau-né (2-5 jours de vie) est à l'étape du développement (Rickett et al, 1990). Plusieurs modèles cholestatiques sont caractérisés par la toxicité de l'accumulation des acides biliaires. Cependant, ce modèle est préconisé pour étudier les dysfonctions hépatiques reliées à la NP puisqu'il a un système du glutathion immature. En fait, il y a moins de glutathion de sécrété dans la bile. Le glutathion agissant comme force osmotique pour la formation du volume biliaire (Erling, 1996 ; Mohann et al, 1994), il en résulte alors, un débit biliaire diminué, caractéristique d'une cholestase.

Des cochons d'Inde nouveau-nés (3 jours de vie) sont anesthésiés avec de la kétamine (50 mg/ml; 0,18 ml/100 g)-Xylazine (20 mg/ml; 0,05 ml/100 g). Un cathéter de polyuréthane de 0,4 mm de diamètre externe est inséré dans la veine jugulaire externe tandis que l'autre extrémité du cathéter est extériorisée dans la région scapulaire de l'animal. Le cathéter est raccordé à une tubulure permettant une plus grande aisance de mouvement de l'animal dans la cage. Cette tubulure est annexée à une seringue qui est installée à un système de pousse-seringue permettant la distribution de solutions intraveineuses. Les animaux sont gardés dans un environnement thermo-régulé en alternance avec un cycle de 12 heures de lumière et 12 heures de noirceur. Après 4 jours de nutrition exclusivement intraveineuse, les animaux sont anesthésiés et sacrifiés par exsanguination. Les fluides et organes nécessaires à la détermination des différents paramètres sont alors prélevés. Cette étude est effectuée en accord avec le Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA).

2.5 PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX *IN VIVO*

Les différents groupes d'animaux utilisés pour ce projet d'étude sont infusés avec différentes solutions. Les concentrations utilisées pour le dextrose, les multivitamines, les acides aminés et les lipides sont près de celles administrées en clinique néonatale. Les animaux ont reçus en continu une solution de base (Base = dextrose 5% (p/v) ou 10 % (P/V) + NaCl 0,45 % (p/v) + héparine 1 U/mL) au taux de 250 mL/Kg/d. La solution de base est administrée avec différentes composantes soient des peroxydes, multivitamines, acides aminés et lipides selon les objectifs poursuivis dans ce projet.

2.5.1 *Mesure de l'impact des différentes composantes de la nutrition parentérale sur le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique*

Puisqu'il est démontré que les composantes de la NP exposées à la lumière génèrent des peroxydes, il est probable que ceux-ci influencent le potentiel redox. Pour atteindre l'objectif, quatre groupes d'animaux ont reçu les solutions intraveineuses suivantes :

- 1) Base + multivitamines (MV) 1 %, solution protégée de la lumière (50 cal/Kg/d).
- 2) Base + MV 1 %, solution exposée à la lumière (320 à 360 lux) (50 cal/Kg/d).
- 3) Base + MV 1 % + acides aminés (AA) 5,2 g/Kg/d (dans la solution d'acides aminés il y a des électrolytes (NaCl 0,97 mmol/kg/d + acétate de Na 0,49 mmol/Kg/d + acétate de K 0,75 mmol/Kg/d + gluconate Ca 240 mg/Kg/d + Mg 0,07 mg/Kg/d) et des oligoéléments (0,11 ml/Kg/d)) + lipides (Lip) 4,2 g/kg/d, solution protégée de la lumière (118 cal/Kg/d).
- 4) Base + MV 1 %+ AA 5,2 g/Kg/d + Lip 4,2 g/Kg/d, solution exposée à la lumière (320 à 360 lux) (118 cal/Kg/d).

La composition des solutions de NP quant à leur contenu en multivitamines, acides aminés, lipides et oligo-éléments est énumérée dans le **tableau 1**.

| | |
|--|--|
| Multivitamines (Multi-12/K₁) | Ascorbate (40 mg/Kg/d), vitamine A (1150 U/Kg/d), vitamine D (200 U/Kg/d), thiamine (0,6 mg/kg/d), riboflavine (11,2 mg/kg/d), chlorhydrate de piridoxine (8 mg/kg/d), niaciamide (8,5 mg/kg/d), d-panthénol (2,5 mg/kg/d), vitamine E (3,5 U/kg/d), vitamine K ₁ (0,1 mg/kg/d), polysorbate 80 (35 mg/kg/d), biotine (0,16 mg/kg/d), acide folique (70 µg/kg/d), vitamine B ₁₂ (0,5 µg/kg/d), mannitol (108 mg/kg/d). |
| Acides aminés (Travasol 10 %) | L-leucine (320 mg/kg/d), L-phénylalanine (320 mg/kg/d), L-lysine (300 mg/kg/d), L-méthionine (300 mg/kg/d), L-isoleucine (250 mg/kg/d), L-valine (240 mg/kg/d), L-histidine (230 mg/kg/d), L-Thréonine (220 mg/kg/d), L-tryptophane (90 mg/kg/d), L-alanine (1,08 g/kg/d), acide aminoacétique (1,08 g/kg/d), L-arginine (540 mg/kg/d), L-proline (220 mg/kg/d), L-tyrosine (20 mg/kg/d). |
| Lipide (Intralipid 20%) | Huile de soya (4,16 g/kg/d), Lécithine d'oeuf purifiée (0,25 g/kg/d), Glycérine anhydre (0,46 g/kg/d). |
| Oligoélément (micro+6) | Zinc sulfate heptahydrate (0,3 mg/kg/d), cupric sulfate pentahydrate (0,04 µL/kg/d), manganese sulfate monohydrate (0,01 mg/kg/d), chromic chloride hexahydrate (0,4 µg/kg/d), sélénium dioxide monohydrate (0,02 mg/kg/d), sodium iodide (6 µg/kg/d). |

Tableau 1 : Composition du contenu des multivitamines, des acides aminés, des lipides et des oligo-éléments. La concentration de chaque composé a été calculée selon le taux d'infusion de 250 mL/Kg/d.

Ce protocole permet l'analyse statistique de l'effet de la lumière, l'effet de la présence des composantes acides aminés-lipides ainsi que l'interaction de ces deux variables sur les paramètres suivants : 1) au foie : le statut et potentiel redox, l'activité de la glutathion réductase et le niveau de 8-isoprostane F_{2α} et 2) le statut et potentiel redox au niveau du globule rouge.

En clinique, les enfants, selon leurs conditions, peuvent recevoir une NP composée de dextrose seulement, de dextrose et de multivitamines ou de dextrose, multivitamines, acides aminés et lipides. À noter que les composantes d'acides aminés et de lipides sont ajoutées en même temps lors de la NP puisque c'est ainsi qu'il est habituellement fait en clinique. Lorsque les animaux sont infusés avec une solution de base ± multivitamines, les composantes sont mélangées ensemble et ils la reçoivent à l'aide d'une seule seringue. Toutefois, lorsqu'ils reçoivent des acides aminés et des lipides, ils sont infusés de la manière

illustrée à la **figure 14**, car en clinique les lipides sont donnés séparément. Quand la préparation des solutions intraveineuses demande d'être à l'abri de la lumière, toutes les précautions sont prises pour diminuer l'exposition à la lumière. Les multivitamines, acides aminés et lipides sont prélevés de leur contenant original selon la quantité nécessaire à l'aide de seringues recouvertes de sac de plastique de couleur jaune afin de minimiser la génération de peroxydes. La couleur jaune absorbe la longueur d'onde qui excite la riboflavine contenu dans les multivitamines, empêchant ainsi la génération de peroxydes (Laborie et al, 1998). Lors de l'infusion à l'animal, la seringue contenant la solution qui doit être protégée de la lumière est également recouverte d'un sac de couleur jaune, et une tubulure ambrée est annexée à la seringue pour minimiser la formation de peroxydes.

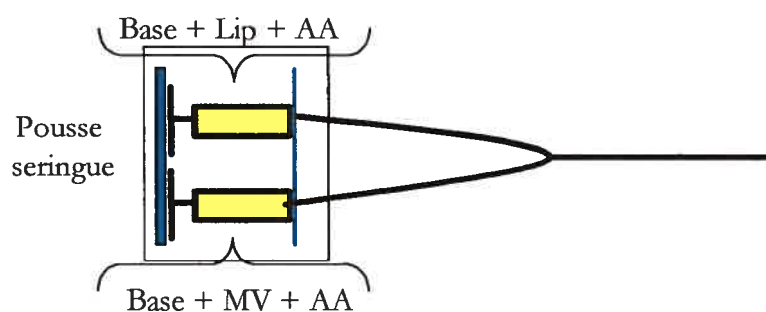


Figure 14 : Schéma démontrant le mode d'infusion de la nutrition parentérale lorsque les animaux reçoivent des acides aminés et lipides. Lip : lipides, AA : acides aminés, MV : multivitamines.

2.5.2 Quantification de l'influence du peroxyde d'hydrogène sur le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique

Ce protocole permet de valider si l'effet des acides aminés-lipides ainsi que l'effet de l'exposition à la lumière de la solution intraveineuse sont associés à leur contenu en H_2O_2 . Pour atteindre cet objectif, quatre groupes d'animaux ont reçu les solutions intraveineuses contenant des quantités croissantes de H_2O_2 .

- 1) Base (50 cal/Kg/d).
- 2) Base + H_2O_2 200 μ M (50 cal/Kg/d).
- 3) Base + H_2O_2 500 μ M (50 cal/Kg/d).
- 4) Base + H_2O_2 800 μ M (50 cal/Kg/d).

Le H_2O_2 est utilisé, puisqu'il est le peroxyde, le plus abondant retrouvé dans la NP tel que décrit par Lavoie et coll. (Lavoie et al, 1997 (b)). Cet objectif sera atteint en mesurant le statut et potentiel redox du glutathion au niveau hépatique.

2.5.3 Vérification de l'influence antiradicalaire des multivitamines sur le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique

Parce que la NP contient des molécules antiradicalaires et des peroxydes, leur interaction a le pouvoir d'influencer le potentiel redox. Pour atteindre cet objectif, quatre groupes d'animaux ont reçu les solutions intraveineuses suivantes :

- 1) Base (50 cal/Kg/d).
- 2) Base + H_2O_2 500 μ M (50 cal/Kg/d).
- 3) Base + MV 1 % + méta-bisulfite de sodium 1 mM (molécule antiperoxyde (Lavoie et al, 1994 (b) ; Brawley et al, 1998)) (50 cal/Kg/d).
- 4) Base + MV 1 % + H_2O_2 500 μ M. (50 cal/Kg/d).

Ce protocole permet l'analyse statistique de l'effet du peroxyde d'hydrogène, l'effet des multivitamines ainsi que l'interaction de ces deux variables au foie, sur le statut et potentiel redox et de l'activité de la glutathion réductase.

2.5.4 Comparaison du statut redox du glutathion hépatique d'animaux présentant ou non une cholestase ou une stéatose induite par la nutrition parentérale

Cet objectif a été rendu possible puisque le laboratoire d'accueil étudiait ces deux complications hépatiques alors, l'opportunité s'ouvrait de vérifier s'il y a un lien entre le statut redox du glutathion et ces complications. Cet objectif sera atteint mesurant le statut redox hépatique, premièrement d'animaux présentant différents débits biliaries et, deuxièmement, de deux groupes d'animaux ayant un degré de stéatose différent.

Différents animaux ont reçu différentes solutions de NP, ces animaux sont regroupés et une corrélation est effectuée entre leur débit biliaire et leur statut redox du glutathion hépatique afin de déterminer si la cholestase peut être influencée par le statut redox du glutathion.

- 1) Base + MV 1 % ou 3 % + AA 5,2 g/Kg/d (dans la solution d'acides aminés il y a des électrolytes (NaCl 0,97 mmol/kg/d + acétate de Na 0,49 mmol/Kg/d + acétate de K 0,75 mmol/Kg/d + gluconate Ca 240 mg/Kg/d + Mg 0,07 mg/Kg/d) et des oligoéléments (0,11 ml/Kg/d)) + Lip 4,2 g/kg/d, (118 cal/Kg/d).
- 2) Base + MV 1 % + AA 5,2 g/Kg/d (dans la solution d'acides aminés il y a des électrolytes (NaCl 0,97 mmol/kg/d + acétate de Na 0,49 mmol/Kg/d + acétate de K 0,75 mmol/Kg/d + gluconate Ca 240 mg/Kg/d + Mg 0,07 mg/Kg/d) et des oligoéléments (0,11 ml/Kg/d)) (70,8 cal/Kg/d).
- 3) Base + H₂O₂ 500 µM (50 cal/Kg/d).

D'autres animaux, indépendamment de la solution intraveineuse reçue, sont regroupés en fonction de leur degré de stéatose afin de déterminer si cette dernière peut être influencée par le statut redox.

- 1) Groupe 1 : stéatose faible (degré de 0-1).
- 2) Groupe 2 : stéatose élevée (degré de 2-3-4).

Un autre type de comparaison est effectué afin de corroborer le protocole précédent, cette fois-ci, les animaux sont regroupés selon leur statut redox.

- 1) Statut redox élevé.
- 2) Statu redox faible.

Ma participation à ces protocoles (2.5.4) est la détermination du statut redox hépatique. Les déterminations du débit biliaire et de la stéatose sont effectuées par les autres membres du laboratoire.

2.6 ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm SEM. Des comparaisons orthogonales entre les groupes sont analysées par ANOVA factorielle. L'homoscédasticité est premièrement vérifiée par le test χ^2 de Bartlett. Dans le cas d'une différence statistiquement significative des variances une transformation logarithmique naturelle ou $1/x$ est effectuée avant l'analyse par ANOVA. Le niveau de signification est basé à $p < 0,05$.

2.7 DOSAGE DES PEROXYDES

Cette technique est utilisée afin de déterminer la concentration des peroxydes générés dans les différentes solutions intraveineuses infusées aux animaux.

La méthode utilisée pour la détection des peroxydes d'hydrogène aussi bien que les peroxydes organiques est basée sur l'oxydation du xylénol orange par le fer ferreux (FOX) (Long et al, 1999; Nourooz-Zadeh et al, 1994). À pH acide, l'ion ferreux (Fe^{+2}) est oxydé en présence de peroxydes ou d'hydroperoxydes pour former l'ion ferrique (Fe^{+3}), lequel réagit avec le xylénol orange pour produire un chromophore qui absorbe à 590 nm linéairement avec un large éventail de peroxyde tels le H_2O_2 et le *tert*-butylhydroperoxyde (TBH) (Lavoie et al, 1994 (b)).

La méthode consiste à mélanger 100 μL d'échantillon avec 1 ml de la solution du réactif de FOX (H_2SO_4 22,5 mM, du xylénol orange 90 μM , de FeCl_2 225 μM et de hydroxytoluène butylé (BHT) 3,6 mM dans du méthanol). Ce mélange est incubé 30 minutes à température pièce et est lu au spectrophotomètre à 590 nm. Une courbe étalon de TBH allant de 0 à 100 μM est exécutée pour quantifier la concentration de peroxydes contenus dans les différentes solutions intraveineuses. Les résultats sont alors exprimés en μM .

Les concentrations de peroxydes générées dans les différentes solutions intraveineuses sont regroupées dans le **tableau 2**.

| Solutions intraveineuses | Concentration en peroxydes (μM) | Figure(s) |
|--|--|-----------|
| B | 3 ± 1 | 20-21-22 |
| B + H ₂ O ₂ 200 μM | 207 ± 14 | 20 |
| B + H ₂ O ₂ 500 μM | 579 ± 5 | 20-21-22 |
| B + H ₂ O ₂ 800 μM | 783 ± 1 | 20 |
| B + MV + bisulfite | 4 ± 2 | 21-22 |
| B + MV + H ₂ O ₂ 500 μM | 729 ± 50 | 21-22 |
| B + MV + Lux | 183 ± 18 | 17-18-19 |
| B + MV - Lux | 93 ± 15 | 17-18-19 |
| B + MV + AA + Lip + Lux | 531 ± 80 | 17-18-19 |
| B + MV + AA + Lip - Lux | 101 ± 5 | 17-18-19 |

Tableau 2 : Peroxydes contenus dans les différentes solutions intraveineuses administrés aux animaux. B : solution de base, MV : multivitamines, bisulfite : méta-bisulfite de sodium, AA : acides aminés, Lip : lipide, + Lux : exposé à la lumière, - Lux : protégé de la lumière. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm SEM.

2.8 DOSAGE DU 8-ISOPROSTANE F_{2x}

Cette technique est utilisée afin de vérifier la présence d'un stress oxydant par la peroxydation lipidique dans le modèle animal ayant reçu différentes solutions intraveineuses.

Le dosage du 8-isoprostane F_{2x}, est basé sur une technique d'anticorps ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay). Une compétition s'exerce entre le 8-isoprostane contenu dans l'échantillon et le 8-isoprostane-acétylcholinestérase, présent dans l'essai, pour l'anticorps polyclonal 8-isoprostane qui est en quantité limitée. Le complexe antigène-anticorps se lie à un anticorps monoclonal anti-lapin d'immunoglobuline G lequel est déjà fixé au fond des puits. Les puits sont lavés pour retirer tout réactif non lié et le réactif Ellman (DTNB) lequel contient le substrat pour l'acétylcholinestérase est alors ajouté aux

puits. Le produit de la réaction enzymatique est jaune et absorbe à 412 nm. Il est proportionnel à la quantité de 8-isoprostane-acétylcholinestérase liée ce qui est donc inversement proportionnel à la quantité de 8-isoprostane provenant de l'échantillon.

Un fragment de foie est homogénéisé (1/4) dans un tampon (Tris 50 mM, EDTA- Na_2 0,1 mM et d'indométhacine 20 μM (dissout dans du méthanol) à pH 7,4). Une centrifugation d'une minute à 5 500 g est effectuée. Le dosage des protéines est réalisé avec la trousse de Bio Rad. L'extraction du 8-isoprostane est faite sur colonne de C_{18} (Lavoie et al, 1994 (a) ; Lavoie et al, 1993) à l'aide de différents solvants : éthanol, éther de pétrole et acétate éthyle. Par la suite, l'évaporation de l'acétate d'éthyle qui a servi à l'élution de l'isoprostane est faite sous jet d'azote. Le culot est dissout dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,4 et la quantité d'isoprostane est déterminée par ELISA. La spécificité de ce dosage selon Cayman Chemical est de 100 %.

2.9 DOSAGE DE LA GLUTATHION RÉDUCTASE

Ce dosage de l'activité de la glutathion réductase est utilisé afin d'expliquer le statut redox du glutathion hépatique trouvé à l'aide de la technique de l'électrophorèse capillaire en solution libre.

Pour son activité la glutathion réductase a besoin du co-facteur NADPH pour permettre la réduction du GSSG en GSH. Le dosage consiste à mesurer le nombre de NADPH oxydé par minute, en fait c'est la disparition du NADPH à 340 nm que nous mesurons. Ceci est possible puisque le GSSG et le NADPH sont en excès par rapport la glutathion réductase qui est l'étape limitante du dosage.

Un morceau du foie est homogénéisé (1/9) dans un tampon TESB (TRIS-HCl 50 mM, EDTA- Na_2 0,1 mM, L-sérine 10 mM, Borate- Na 20 mM, pH 7,6) et centrifugé une minute à 5 500 g. Une dilution 1/10 avec du TESB est effectuée. L'échantillon est divisé pour le dosage des protéines fait avec la trousse de Bio-Rad ainsi que pour la détermination

de l'activité de la glutathion réductase. Dans une cuvette de spectrophotomètre, tous les réactifs sont ajoutés: 700 μL du tampon TESB, 100 μL NADPH (0,1 mM), 100 μL GSSG (1 mM) ainsi que l'ajout de l'échantillon contenant la glutathion réductase. Cette dernière, va permettre à la réaction de débiter. Ce mélange est lu au spectrophotomètre à 340 nm durant une période de 13 minutes. À l'aide de l'absorbance par minute du NADPH pour les huit dernières minutes, la concentration correspondante est calculée à l'aide du coefficient d'extinction molaire du NADPH ($6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). L'activité de la glutathion réductase est exprimée en nmole/min/mg de protéines à température pièce.

2.10 DÉTERMINATION DU DÉBIT BILIAIRE

La chirurgie permettant la collecte biliaire est effectuée à une heure comparable pour les divers groupes étudiés. En fait, les animaux subissent une ligature de la vésicule biliaire. Par la suite, le conduit biliaire reçoit une canule, ce qui permet de collecter la bile par intervalles de vingt minutes sur une période deux heures (Duerksen et al, 1996). La température des animaux est maintenue constante au cours de la chirurgie et de la collecte biliaire. Le débit biliaire est calculé sur les trois premiers échantillons (première heure de la collecte) ainsi que sur les trois derniers, soit la deuxième heure de la collecte. Les débits sont exprimés en $\mu\text{L}/\text{min}/\text{g}$ foie et en $\mu\text{L}/\text{min}/100 \text{ g}$ pds corporel.

2.11 DÉTERMINATION DE LA STÉATOSE

La sévérité de la stéatose, est évaluée par un pathologiste (Dr. Pierre Brochu) et un hépatologue (Dr. Fernando Alvarez) à l'aide d'une coloration histologique d'hématoxyline-eosine. Elle est établie grâce à une charte de degré de 0 à 4. 1 : présence de vacuoles isolées, 2 : présence de foyer de vacuoles focalisées de façon hétérogène, 3 : présence de rares régions sans vacuoles, 4 : présence de vacuoles dans tout le tissu.

3. RÉSULTATS

3.1 VALIDATION D'UNE MÉTHODE D'ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE EN SOLUTION LIBRE AFIN DE PERMETTRE LA DÉTERMINATION SIMULTANÉE DU GLUTATHION SOUS FORME RÉDUITE ET OXYDÉE

3.1.1 *L'effet du kV*

L'électrophorèse capillaire en solution libre permet la détermination simultanée du GSH et GSSG contenus dans un échantillon. Différents voltages ont été essayés afin de déterminer quel est celui qui permettait une meilleure séparation du GSH et GSSG dans un échantillon hépatique et de globule rouge. Le voltage de 18 kV s'est avéré le plus efficace (données non présentées).

3.1.2 *Spécificité des pics*

Afin de déterminer s'il s'agissait bien de GSH et GSSG, nous avons procédé à un ajout de GSH ou de GSSG standard dans l'échantillon, afin d'augmenter l'intensité des pics sur l'électrophérogramme. Nous avons également vérifié l'authenticité des pics par l'utilisation de substances chimiques capables de modifier le GSH et GSSG. La spécificité du GSH est validée à l'aide du N-éthylmaleimide (NEM) puisque le GSH conjugué au NEM forme un nouveau pic (GS-NEM), lequel n'a pas le même temps d'éluion que le pic GSH (**figure 15**). Le dithiothréitol (DTT), quant à lui, a été ajouté au GSSG pour vérifier la spécificité de ce dernier puisque le DTT réduit les ponts dissulfures et forme du GSH. Il y a eu disparition du GSSG autant dans l'étalon que dans l'échantillon de foie (résultats non présentés).

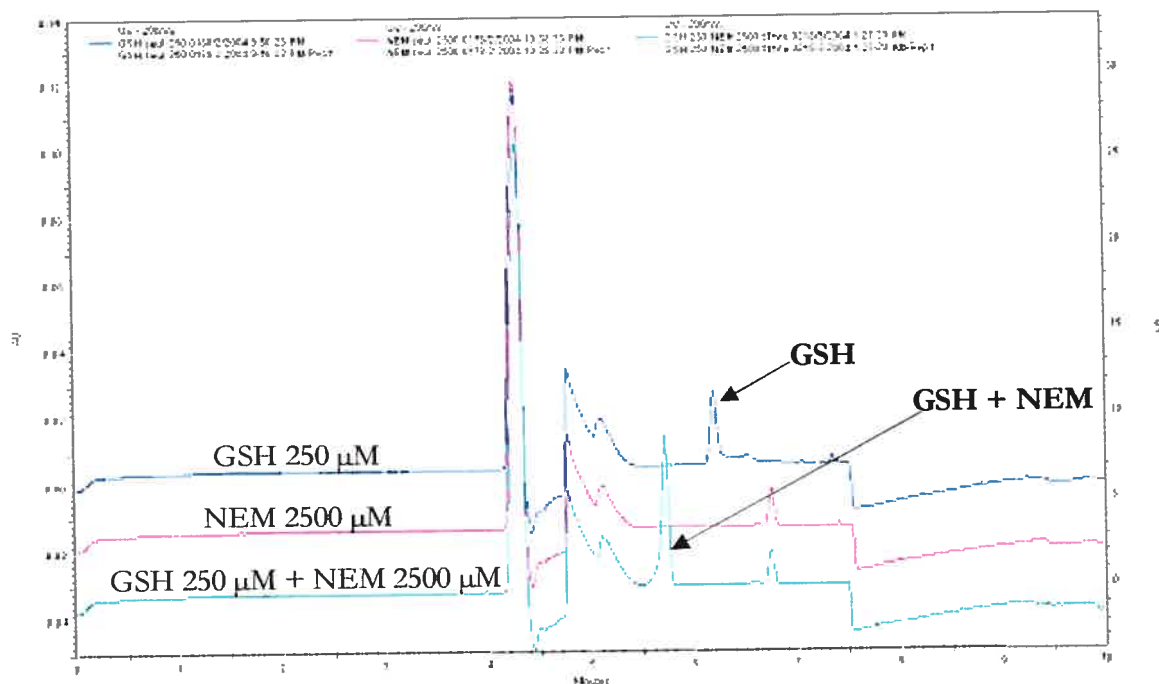


Figure 15 : Électrophérogramme de la disparition du pic de GSH faite à l'aide du N-éthylmaleimide (NEM).

3.1.3 Coefficient de variation

Les coefficients de variations (CV) intra- et inter-essais pour les concentrations et les temps de rétention des courbes étalons ainsi que des échantillons hépatiques et de globules rouges sont représentés dans le **tableau 3**. Puisque les CV de l'ordonnée à l'origine des courbes étalons sont très élevés, les courbes étalons sont refaites à chacune des expérimentations. En générale, les CV intra-essai sont inférieurs à ceux d'inter-essai cependant, le CV intra-essai pour le GSH dans l'échantillon hépatique est supérieur à celui du CV inter-essai. Les temps de rétention des courbes étalons sont : GSH $6,099 \pm 0,072$ min, $n=10$ et GSSG $6,304 \pm 0,05$ min, $n=10$.

| | | CV intra-essai (%) | | CV inter-essai (%) | |
|--------------------------------------|-----------------------------|--------------------|-------|--------------------|-------|
| | | GSH | GSSG | GSH | GSSG |
| Courbe étalon | Pente (UA/ μ M) | - | - | 7 | 7 |
| | Ordonnée (UA) | - | - | 91 | 734 |
| | Temps de rétention (min) | 0,672 | 0,490 | 3,769 | 2,509 |
| Échantillon hépatique | Concentration (μ M) | 13 | 5 | 7 | 13 |
| | Temps de rétention (min) | 0,736 | 0,798 | 2,66 | 2,885 |
| Échantillon globule rouge | Concentration (μ M) | 17 | 8 | - | - |
| | Temps de rétention (min) | 0,394 | 0,411 | - | - |

Tableau 3 : Coefficient de variation (CV) de la concentration et du temps de rétention du GSH et GSSG pour les courbes étalons et un échantillon hépatique ainsi que d'un échantillon de globules rouges. $n=10$ pour chacun des paramètres cependant, $n=4$ pour les CV intra-essai du temps de rétention du GSH et du GSSG pour les courbes étalons. Les CV sont exprimés en pourcentage.

3.1.4 Seuil de détection

Les seuils de détection du GSH et du GSSG, calculés à partir d'un intervalle de confiance de 95% de l'ordonnée à l'origine, sont respectivement de 1,23 μ M et 0,05 μ M.

3.1.5 L'effet de la congélation

L'effet du temps, 18 mois, de congélation à - 80 °C sur le glutathion total apparaît à la **figure 16**. Le temps n'a pas d'effet ($r^2 = 0,002$). Il en est de même pour la concentration

du GSH ($y=0,002x \text{ mM/mois} + 6,758 \text{ mM}$; $r^2= 0,0003$) et du GSSG ($y=0,002x \text{ mM/mois} + 0,269 \text{ mM}$; $r^2= 0,03$).

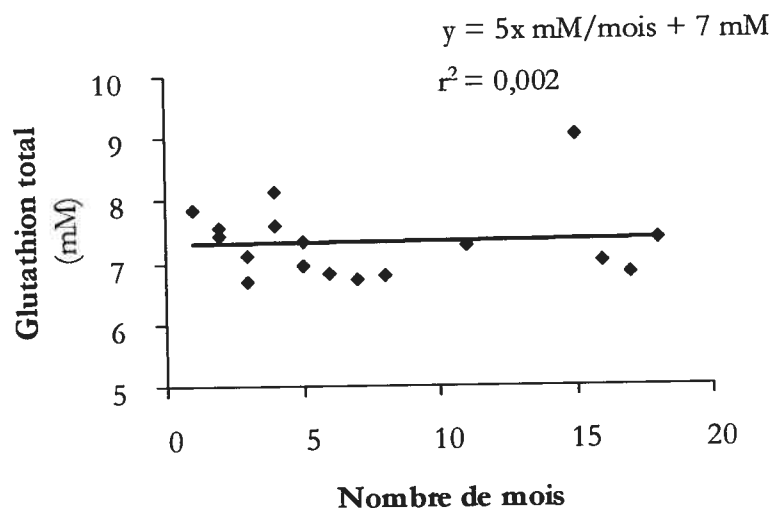


Figure 16 : Variation du temps de congélation sur la concentration du glutathion en mM sur un échantillon hépatique sur un période de 18 mois allant du mois de novembre 2002 au mois d'avril 2004.

3.1.6 Comparaison de techniques

Cette nouvelle méthode se doit d'être corroborée avec une méthode couramment utilisée dans le laboratoire soit la méthode de dosage enzymatique de Griffith (Griffith, 1980). La concentration en glutathion total (GSH + 2 GSSG) dans des échantillons hépatiques déterminée par la méthode d'électrophorèse capillaire n'est significativement pas différente de celle mesurée par la méthode enzymatique (test du t de Student pour mesures répétées = 1,17, $p>0,2$; étendue : 12 à 70 nmoles/mg de protéines, $n= 10$).

3.2 PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX *IN VIVO*

Initialement, le poids corporel (102 ± 1 g, $n=59$) était similaire entre les groupes des différents protocoles expérimentaux. À la fin de l'expérimentation, soit après quatre jours d'infusion de solutions intraveineuses, la perte de poids était moindre ($p<0,01$) chez les animaux ayant reçu un apport calorique plus grand puisque la solution contient des acides aminés-lipides (4 ± 2 g, $n=13$) alors que les autres groupes (13 ± 2 g, $n=13$) dans le protocole 2.5.1 ont un apport calorique inférieur. Cette perte de poids du modèle animal de NP a déjà été constatée dans des études antérieures du laboratoire (Chessex et al, 1999 ; Chessex et al, 2002). Dans les autres protocoles, il n'y avait pas de différence de perte de poids significative entre les groupes d'animaux comparés (protocole 2.5.2. 16 ± 2 g, $n=18$; protocole 2.5.3 16 ± 2 g, $n=25$). Le poids du foie, relatif au poids corporel ne différait pas entre les groupes d'animaux ($3,61 \pm 0,07$ %, $n=59$) ce qui implique qu'un animal plus gros a un fois plus gros.

3.2.1 Mesure de l'impact des différentes composantes de la nutrition parentérale sur le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique

Les animaux de cet objectif ont reçu différentes solutions de NP afin de vérifier et de séparer l'effet acides aminés-lipides de l'effet de l'exposition à la lumière ambiante. Le contenu en peroxydes de ces différentes solutions intraveineuses est mesuré et est rapporté au **tableau 2**.

La **figure 17 A** présente le statut redox hépatique. Un effet ($p<0,05$) acides aminés-lipides, est observé par l'augmentation du statut redox. Puisque le statut redox est le reflet du potentiel redox, ce dernier est calculé à l'aide de l'équation de Nernst et est représenté à la **figure 17 B**. Une interaction significative ($p<0,05$) est présente entre l'effet acides aminés-lipides et l'exposition à la lumière sur le potentiel redox. Ceci a permis d'analyser l'effet lumière selon la composition des solutions infusées. Le potentiel redox est statistiquement plus réducteur ($p<0,05$) en présence de lumière lorsque toutes les

composantes de la NP sont présentes. Afin d'expliquer l'effet acides aminés-lipides observé sur le statut redox et sur le potentiel redox lorsqu'il y a présence de lumière, différents facteurs pouvant influencer le statut et potentiel redox sont observés. Le statut redox peut être influencé par la glutathion réductase qui est l'enzyme permettant la transformation du GSSG en GSH. L'activité de la glutathion réductase est montrée à la **figure 18 A** cependant, l'analyse statistique ne révèle aucune différence entre les groupes. Le potentiel redox est aussi influencé par la concentration totale en glutathion (**figure 18 B**). Cependant, les concentrations totales en glutathion ne diffèrent pas selon les groupes.

Bien que le statut redox est un indice du stress oxydant, nous avons utilisé le 8-isoprostane F_{2a} , afin de vérifier la présence de ce stress sur les lipides endogènes. La quantité du 8-isoprostane F_{2a} (**figure 18 C**) en présence de lumière est plus basse ($p < 0,01$) que lorsque les solutions sont exposées à la lumière.

Le statut et potentiel redox au niveau du globule rouge sont observés pour discriminer si les observations faites au foie sont spécifiques à cet organe. Seuls les acides aminés-lipides influencent le statut (**figure 19 A**) et le potentiel redox (**figure 19 B**) ($p < 0,05$). La **figure 19 C** démontre que le glutathion total ne révèle aucune différence entre les groupes.

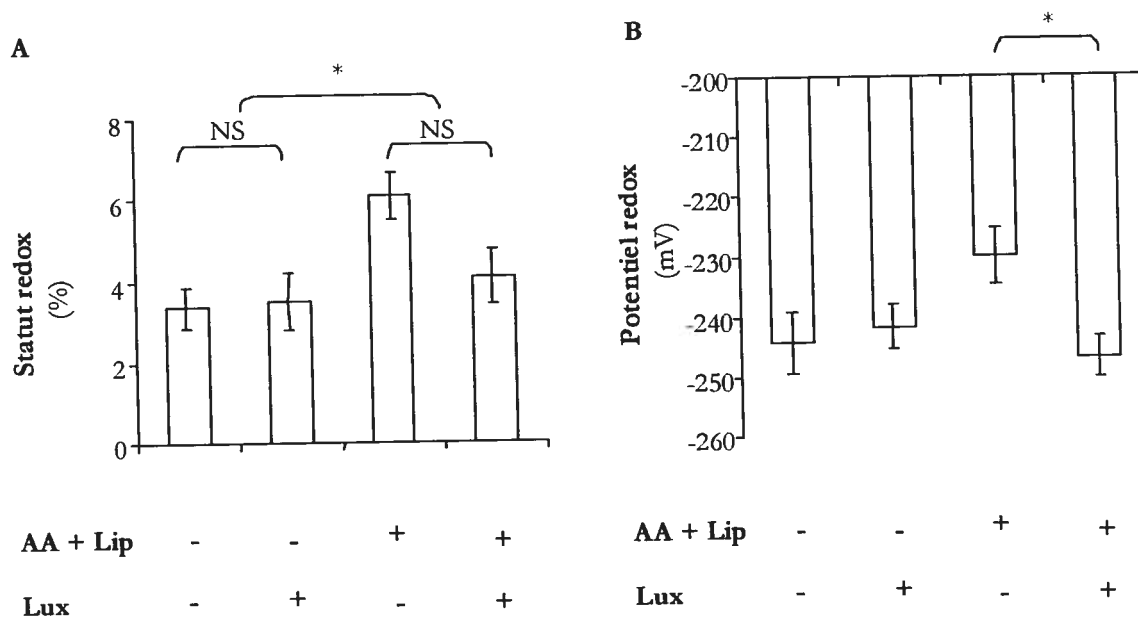


Figure 17 : Effets des acides aminés-lipides et de l'exposition à la lumière des solutions intraveineuses sur le statut et potentiel redox du glutathion hépatique. **A)** Statut redox **B)** Potentiel redox. Tous les différents groupes de la figure ont reçu la solution de base et des multivitamines 1% (v/v). AA : acides aminés 5,2 g/kg/d, Lip : lipides 4,2 g/d, Lux : lumière ambiante de la pièce. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm SEM, n = 5-8, * : $p < 0,05$.

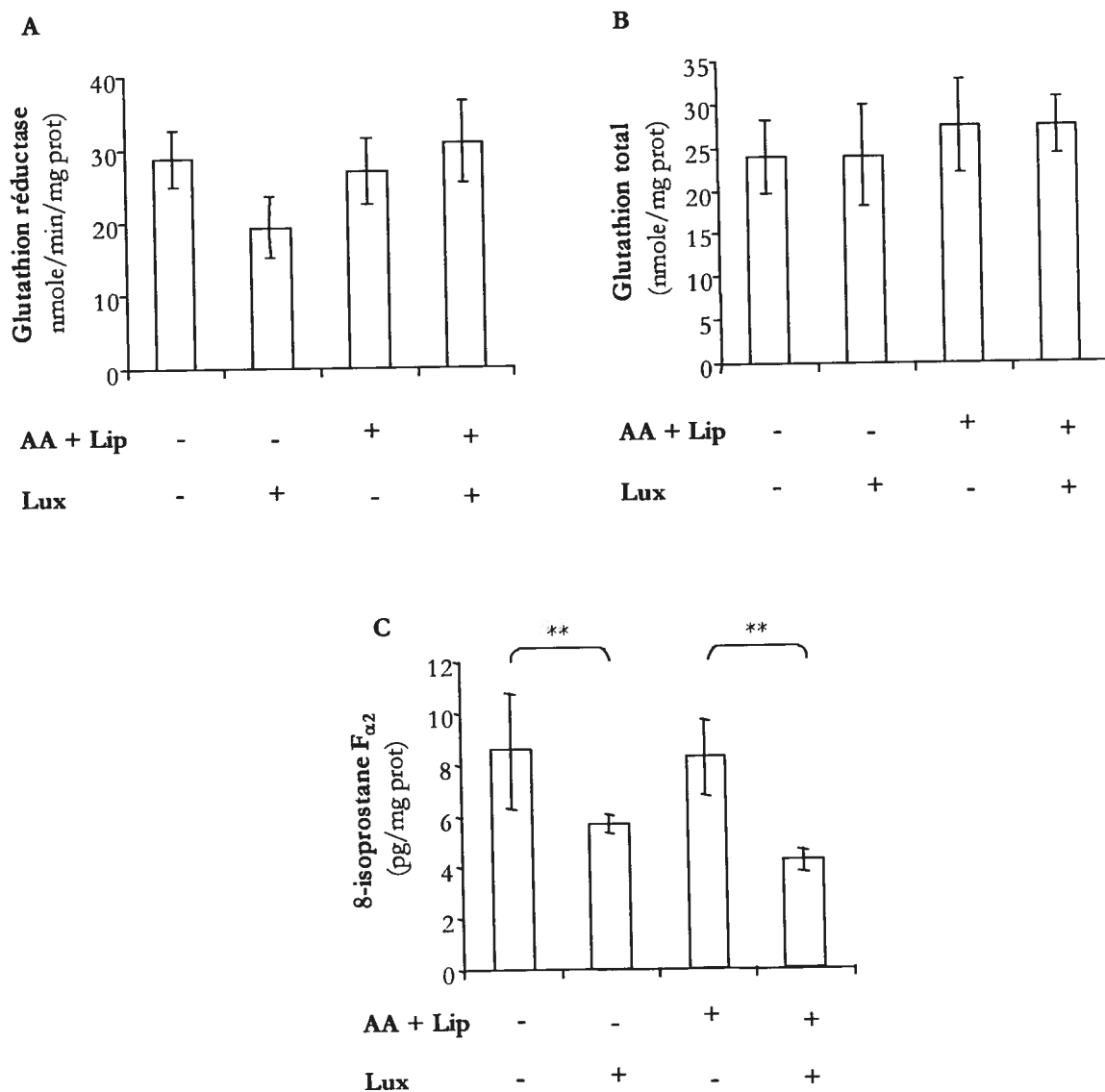


Figure 18 : Paramètres pouvant expliquer l'effet observé sur le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique. **A)** Glutathion réductase **B)** Glutathion total **C)** 8-isoprostane $F_{2\alpha}$. Tous les différents groupes de la figure ont reçu la solution de base et des multivitamines 1% (v/v), AA : acides aminés 5,2 /kg/d, Lip : lipides 4,2/kg/d, Lux : lumière ambiante de la pièce. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm SEM, n = 5-8, **: p<0,01.

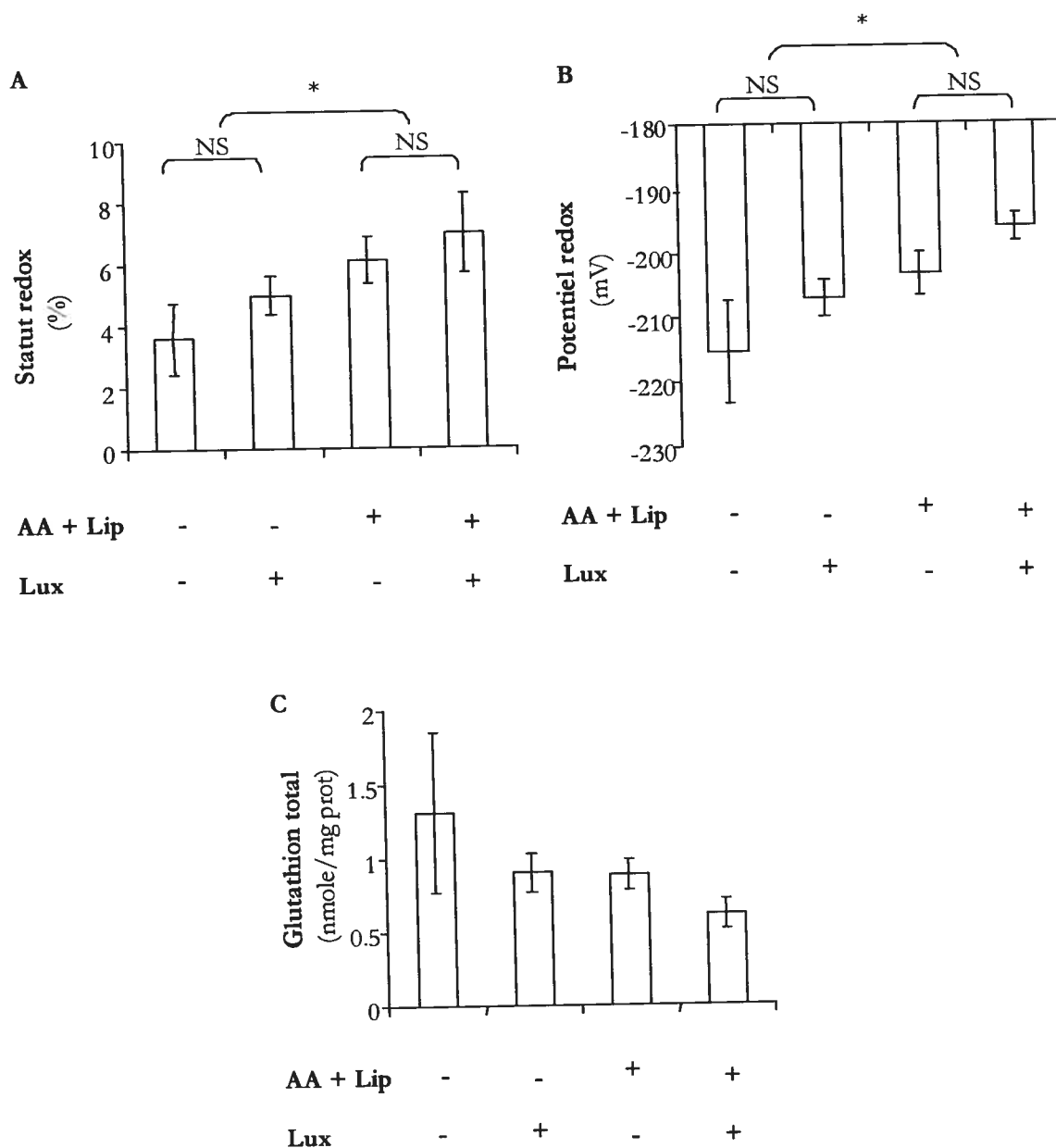


Figure 19 : Effets des acides aminés-lipides et de l'exposition à la lumière des solutions intraveineuses au niveau du globule rouge. **A)** Statut redox **B)** Potentiel redox **C)** Glutathion total. Tous les différents groupes de la figure ont reçu la solution de base + des multivitamines 1% (v/v). AA : acides aminés 5,2 /kg/d, Lip : lipides 4,2 /d, Lux : lumière ambiante de la pièce. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm SEM, n = 4-8, *: p<0,05

3.2.2 Quantification de l'influence du peroxyde d'hydrogène sur le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique

Les animaux de cet objectif ont reçu différentes solutions intraveineuses composées de la solution de base et de différentes concentrations de H_2O_2 . Ceci, afin de vérifier l'influence des peroxydes sur le statut et potentiel redox du foie. Par la même occasion, nous avons observé si l'effet acides aminés-lipides de la NP ainsi que l'effet lumière sont comparables à l'effet du H_2O_2 . Le contenu en peroxydes de ces différentes solutions intraveineuses est mesuré et est rapporté au **tableau 2**.

L'effet oxydant du H_2O_2 sur le statut (**figure 20 A**) ($p < 0,01$) et le potentiel (**figure 20 B**) ($p < 0,01$) redox est significatif à une concentration supérieure à 0,2 mM de H_2O_2 .

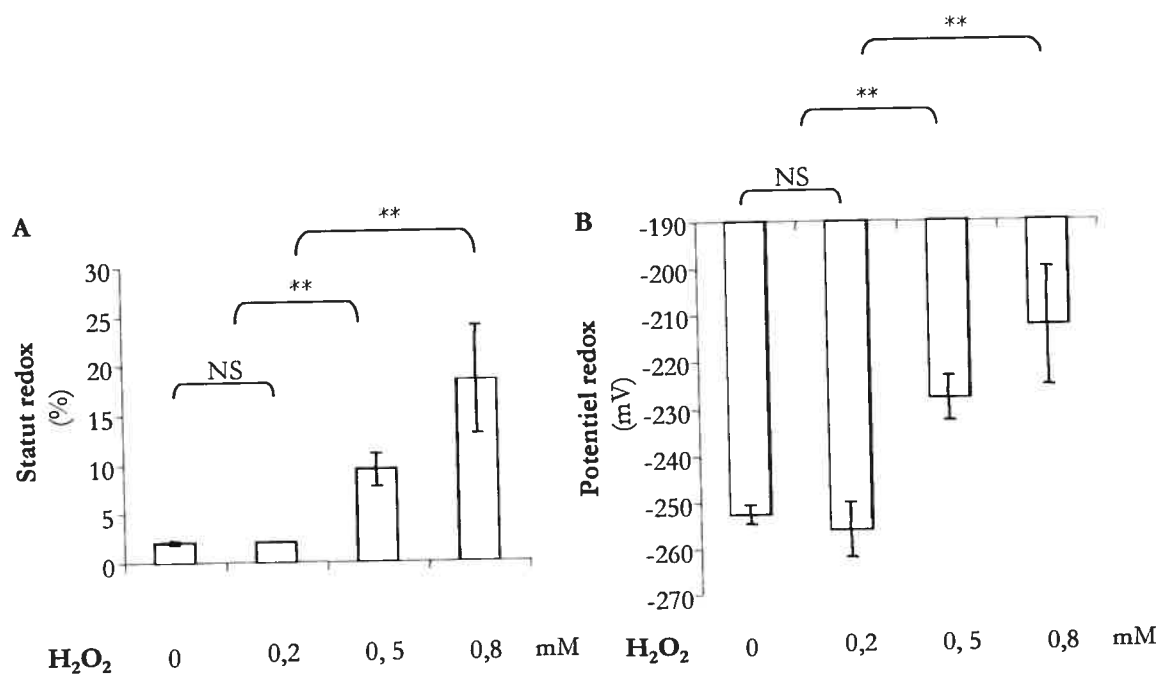


Figure 20 : L'influence du H_2O_2 au niveau hépatique. **A)** Statut redox **B)** Potentiel redox. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm SEM, $n = 4-6$, ** : $p < 0,01$. Le statut et potentiel redox des groupes ayant reçu 0 et 0,5 mM de H_2O_2 sont aussi présentés à la figure 21.

3.2.3 Vérification de l'influence antiradicalaire des multivitamines sur le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique

Puisque nous voulons vérifier l'effet des multivitamines sur le H_2O_2 , les animaux de cet objectif ont reçu différentes solutions intraveineuses composées de la solution de base avec ou non des multivitamines et avec ou non des H_2O_2 . Afin d'enrayer toute trace de peroxyde généré par les multivitamines exposées à la lumière (**tableau 2**), du méta-bisulfite de sodium est ajouté dans la solution intraveineuse composée de la solution de base et de multivitamines. De cette façon, nous avons seulement l'effet des multivitamines sur le statut et potentiel redox.

Une interaction subsiste entre l'effet H_2O_2 et des multivitamines sur le statut redox du glutathion ($p < 0,05$) (**figure 21 A**) et est aussi reflétée au niveau du potentiel redox ($p < 0,01$) (**figure 21 B**). Cependant, le peroxyde augmente significativement le statut redox autant en présence ($p < 0,05$) qu'en absence de multivitamines ($p < 0,01$). L'interaction démontre que ces augmentations sont d'ampleurs différentes. Les peroxydes ont un effet significativement plus oxydant seulement en absence de multivitamines. L'interaction entre l'effet H_2O_2 et des multivitamines est significatif ($p < 0,01$) sur l'activité de la glutathion réductase (**figure 22 A**). Une faible activité de la glutathion réductase dans le groupe H_2O_2 sans multivitamines ($p < 0,01$) peut expliquer son effet sur le statut redox. Une interaction significative ($p < 0,05$) entre les effets du peroxyde et des multivitamines sur le glutathion total (**figure 22 B**) est aussi documentée. Le peroxyde en absence de multivitamines ne démontre aucun effet sur la concentration en glutathion total. Cependant, en présence de multivitamines, la concentration de glutathion total est statistiquement augmentée ($p < 0,05$).

Par ailleurs, l'effet radicalaire du H_2O_2 observé en absence de multivitamines est démontré au niveau de la peroxydation lipidique par le 8-isoprostane F_{2x} hépatique (64 ± 19 pg/mg prot, $n = 4$, vs 8 ± 1 $n = 3$, $p < 0,05$) pour les groupes ayant reçu la solution de base $\pm H_2O_2$. De plus, la relation ($r^2 = 0,57$; $p < 0,01$) entre le statut redox et le 8-isoprostane F_{2x} (**figure 23**) suggère que l'effet peroxyde sur le redox pourrait passer par un processus radicalaire.

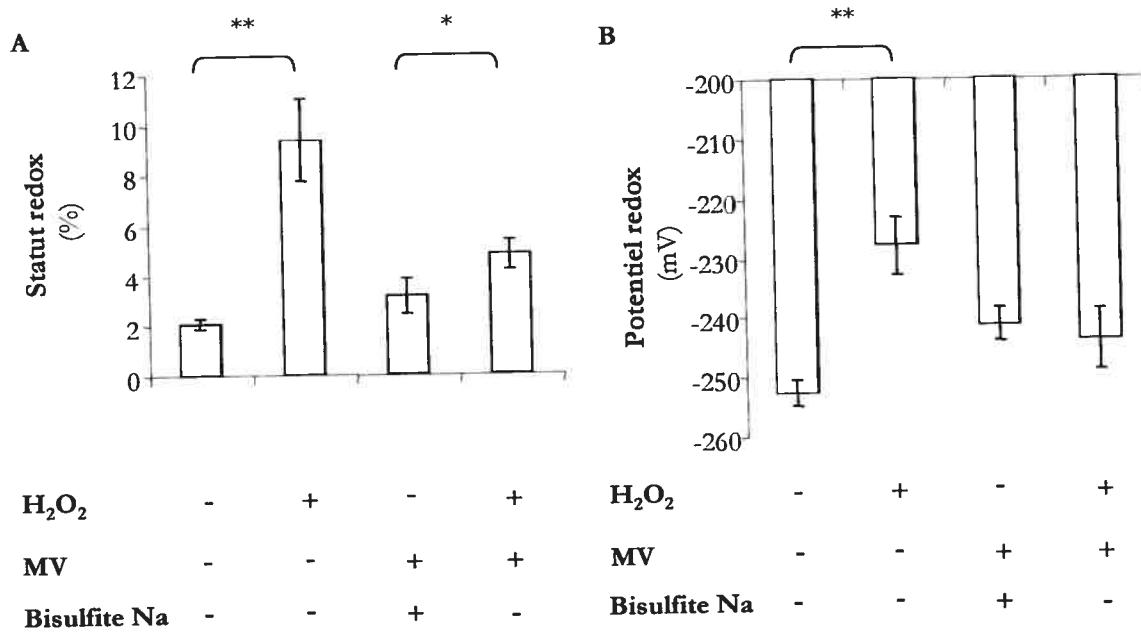


Figure 21 : L'effet des peroxydes au niveau hépatique **A)** Statut redox **B)** Potentiel redox. Tous les animaux ont été infusés avec la solution intraveineuse de base. H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène 500 μM, MV : multivitamines 1% (v/v), bisulfite Na : méta-bisulfite de sodium 1 mM. Les résultats sont exprimés selon la moyenne ± SEM, n=4-8, * : p < 0,05 et ** : p < 0,001.

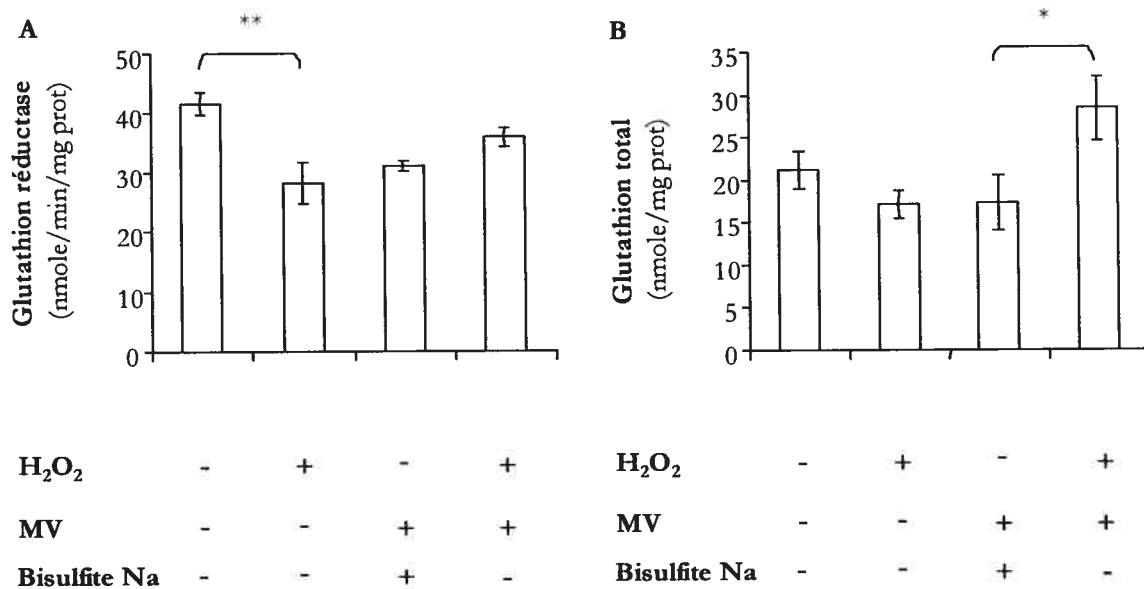


Figure 22 : Paramètres pouvant expliquer l'effet du H₂O₂ observé sur le statut et potentiel redox du glutathion hépatique. **A**) Glutathion réductase **B**) Glutathion total. Tous les animaux sont infusés avec la solution intraveineuse de base. H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène 500 μ M, MV : multivitamines 1% (v/v), bisulfite Na : méta-bisulfite de sodium 1 mM. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm SEM, n=4-7, * : p < 0,05 et ** : p < 0,001.

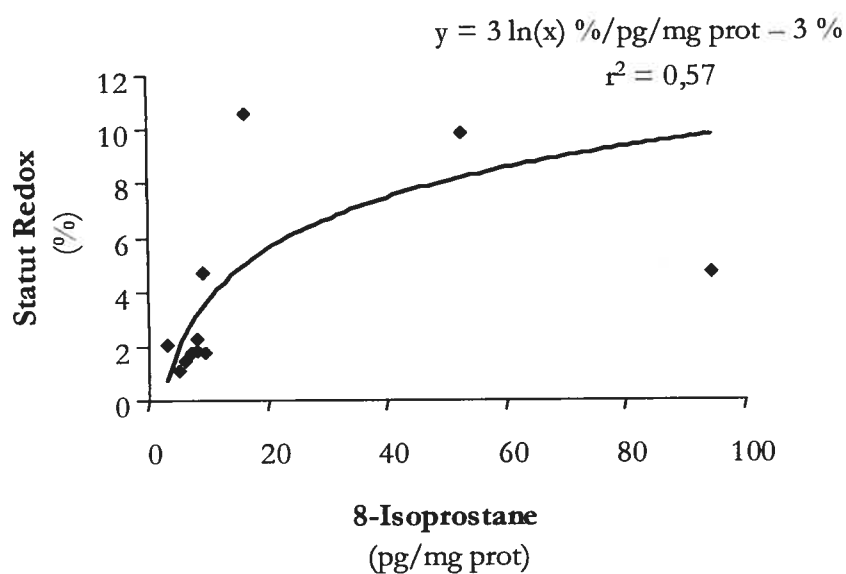


Figure 23 : Relation entre le statut redox du glutathion et les niveaux de 8-isoprostane F_{2 α} hépatique.

3.2.4 Comparaison du statut redox du glutathion hépatique d'animaux avec ou non une cholestase ou une stéatose induite par la nutrition parentérale

Afin de vérifier s'il existait une association entre le statut redox du glutathion et la cholestase, différentes analyses sont effectuées. La pente du débit biliaire mesuré aux 20 minutes différait grandement entre la première et la deuxième heure de collecte (données non présentées). Les corrélations ont été calculées pour chacune de ces 2 périodes. La corrélation entre le débit biliaire mesuré sur la première heure et le statut redox du glutathion est significative ($r^2=0,27$; $p<0,05$) lorsque le débit est exprimé en $\mu\text{L}/\text{min}/\text{g}$ foie (**figure 24 A**), tandis qu'elle ne l'est pas ($r^2=0,17$) lorsque exprimé en $100 \text{ g pds corporel}$ (**figure 24 B**). La corrélation n'est pas significative ($r<0,20$) avec le débit biliaire mesuré sur la deuxième heure, que le débit soit mesuré par g de foie ou par 100 g de poids corporel.

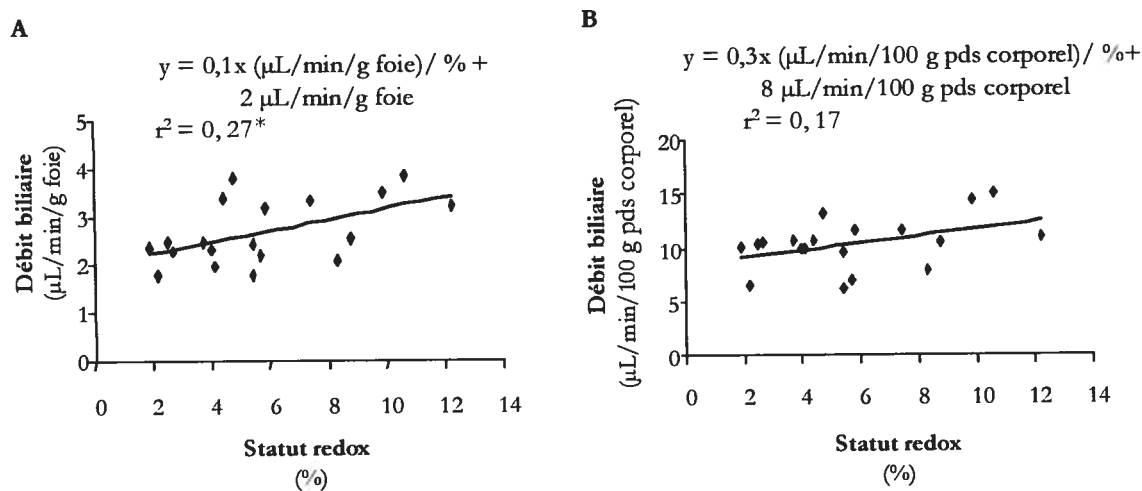


Figure 24 : Corrélation entre le débit biliaire et le statut redox du glutathion pour la première heure de la collecte biliaire. **A)** Débit biliaire exprimé en $\mu\text{L}/\text{min}/\text{g}$ foie. **B)** Débit biliaire exprimé en $\mu\text{L}/\text{min}/100 \text{ g pds corporel}$, * : $p<0,05$.

L'association entre le statut redox et la stéatose est recherchée par deux types de comparaisons. La première en comparant le statut redox de deux groupes d'animaux présentant différents niveaux de stéatose (**figure 25 A**). Le statut redox de ces deux groupes (**figure 25 B**) n'est significativement pas différent. La deuxième comparaison est faite chez deux groupes d'animaux ayant des statuts redox différents (**figure 26 B**). Le degré de stéatose (**figure 26 B**) n'est pas différent.

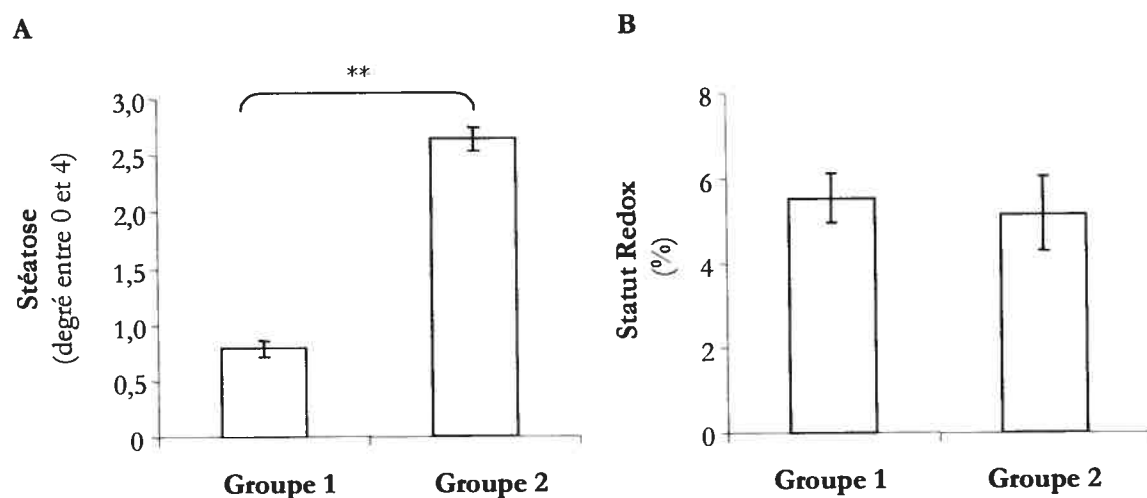


Figure 25 : Comparaison entre le statut redox du glutathion et la stéatose de deux groupes d'animaux ayant des stéatoses différentes. **A**) Regroupement de la stéatose de différents animaux en deux sous-groupes : Groupe 1 : stéatose 0 et 1, n = 60 et le Groupe 2 : stéatose 2,3 et 4, n = 32. **B**) Statut redox des deux sous-groupes de stéatose, Groupe 1 : stéatose 0 et 1, n = 57 et le Groupe 2 : stéatose 2,3 et 4, n = 32. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm SEM, **: $p < 0,01$.

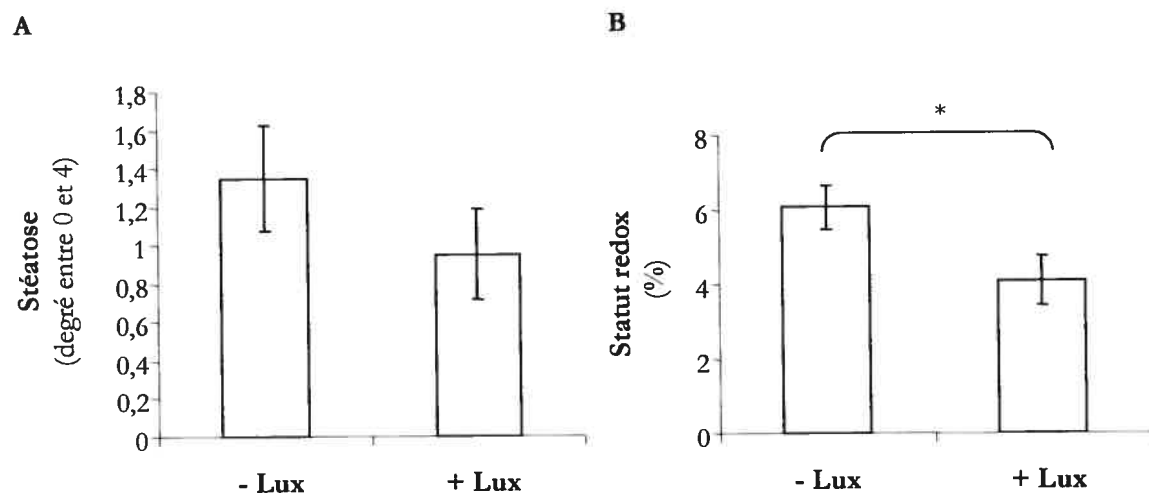


Figure 26 : Comparaison entre la stéatose et le statut redox du glutathion de deux groupes d'animaux ayant des statuts redox différents. **A)** Stéatose **B)** Statut redox. Les groupes ont reçu les mêmes solutions intraveineuses composées de base + multivitamines 1 % + acides aminés 5,2 g/kg/d + lipides 4,2 g/kg/d exposées ou non à la lumière ambiante (lux) (320 à 360 lux). Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm SEM, n = 6-7, * : p<0,05

4. DISCUSSION

4.1 VALIDATION D'UNE MÉTHODE D'ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE EN SOLUTION LIBRE

Plusieurs méthodes existent pour quantifier le glutathion total. La concentration du glutathion est habituellement déterminée à l'aide d'une méthode enzymatique utilisant la glutathion réductase et l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DNTB) comme réactif spécifique pour le groupement thiol (Griffith, 1980). Le cycle généré par la glutathion réductase permet la spécificité du dosage pour le thiol du GSH. Cette manière de procéder pour la détermination du glutathion est reproductible et a fait ses preuves.

Cependant, lorsque vient le temps de discriminer le GSH et le GSSG par méthode enzymatique classique, cela devient plus laborieux dû à des étapes supplémentaires problématiques engendrées par l'utilisation de N-éthylmaleinide (NEM) ou du 2-vinylpyridine (2-VP). Par exemple, le NEM est un inhibiteur potentiel de la glutathion réductase, et de ce fait, il doit être enlevé de l'échantillon avant le dosage, ce qui est ardu et peut occasionner des erreurs dans le dosage (Griffith, 1980). En outre, l'utilisation du 2-VP, demande quelques heures d'incubation puisqu'il prend du temps à réagir. Alors, une portion du GSH peut être oxydée avant que le GSH ne soit conjugué au 2-VP, ce qui apporte une variation dans le résultat. Le 2-VP peut aussi interférer avec le dosage classique de Griffith parce qu'il réagit avec le GSH et que ce dosage est basé sur le recyclage du GSSG en GSH.

L'électrophorèse capillaire en solution libre permet la détermination simultanée du GSH et GSSG (Blessum et al, 1999 ; Cappiello et al, 1993 ; Ercal et al, 1996 ; Muscari et al, 1998 ; Serru et al, 2001 ; Robert et al, 1991). Elle est une méthode de séparation analytique très performante, rapide, quantitative et reproductible. De plus, elle est automatisée et nécessite des petits volumes d'échantillons. Une contrainte de cette méthode est que tout le traitement de l'échantillon doit être effectué dans une période de six minutes après le prélèvement. Toutefois, la même problématique est observée lorsque nous utilisons le NEM ou le 2-VP et la méthode enzymatique.

Les limites de détection avec l'électrophorèse capillaire en solution libre sont relativement faibles (GSH : 61,5 fmoles et GSSG : 2,5 fmoles) par rapport au seuil observé

avec la méthode enzymatique de Griffith (20 pmoles) pour l'ensemble du GSH et GSSG (Lavoie et al, 1997 (a) ; Chessex et al, 1999).

Pour ces différentes raisons, la méthode choisie dans la présente étude pour l'analyse simultanée du GSH et GSSG, est l'électrophorèse capillaire en solution libre avec détection UV. Cependant, le coefficient de variation de l'ordonnée à l'origine de la courbe étalon est élevé. Pour cette raison, les courbes étalons sont refaites à chacune des nouvelles déterminations. Les coefficients de variation intra et inter-essai pour le GSH d'un échantillon hépatique sont similaires et concordent avec ceux obtenus par l'équipe de Serru utilisant la même méthode (Serru et al, 2001).

Un point important de cette méthode est le traitement de l'échantillon à l'acide ce qui permet de se débarrasser par précipitation des protéines dont les enzymes du métabolisme du glutathion. Sans cette étape de précipitation, les résultats du statut redox et par conséquent le potentiel redox seraient faux. Cependant, certains rapportent que la procédure de précipitation des protéines sanguines par acidification soit par l'acide perchlorique ou par l'acide trichloroacétique, provoque une légère oxydation du GSH en GSSG. En fait, ces acides favorisent la formation de H_2O_2 (Carru et al, 2002). La formation de H_2O_2 peut alors interférer avec le GSH et surestimer la valeur du GSSG et ainsi mener à une surestimation du stress oxydant. D'autres laboratoires démontrent que la précipitation à l'acide méta-phosphorique (MPA), acide utilisé dans notre étude, stabilise les niveaux de GSH et de GSSG sans former de H_2O_2 (Lang et al, 2000 ; Mills et al, 1994 ; Srivastava et al, 1968 ; Stempak et al, 2001). L'équipe de Stempak rapporte que le MPA stabilise les niveaux de GSH et GSSG dans un échantillon sanguin pour une période de 4 semaines (Stempak et al, 2001). Nous démontrons sensiblement la même stabilité pour le glutathion total et les niveaux de GSH et GSSG dans un échantillon hépatique et ceux-ci sont stables pour une période d'au moins 18 mois.

Puisque l'électrophorèse capillaire est une méthode nouvellement utilisée dans le laboratoire, les résultats obtenus doivent être corroborés par une autre méthode. Ainsi, les concentrations en glutathion total d'échantillons hépatiques obtenues par l'électrophorèse capillaire ne sont pas différentes des résultats observés par la méthode enzymatique

(Griffith, 1980). Cette validation est faite uniquement pour le glutathion total, puisque la méthode classique enzymatique est fiable seulement pour la concentration en glutathion total.

La sélectivité de la méthode d'électrophorèse capillaire en solution libre est effectuée parallèlement pour confirmer que les pics trouvés sur l'électrophérogramme de l'échantillon correspondent bien aux pics recherchés de GSH et GSSG. La sélectivité est vérifiée par l'ajout d'une petite quantité arbitraire de GSH ou de GSSG au duplicata de l'échantillon à analyser afin d'en augmenter la réponse au détecteur. Par comparaison, il est donc facile de discriminer les pics recherchés des autres pics présents. Le NEM est utilisé pour convertir le GSH en GSH-NEM, ce qui résulte en un déplacement du pic de GSH. Le pic de GSSG est modifié par la présence de dithiotréitol (DTT). L'équipe de Serru a observé les mêmes résultats (Serru et al, 2001).

De plus, nos résultats vont dans la même direction que l'analyse de l'authenticité des pics et confirme qu'il s'agit bien de GSH et GSSG. Schafer et coll. ont publié une étude montrant qu'un potentiel redox situé entre -210 et -180 mV est associé à l'état de différenciation cellulaire (Schafer et al, 2001). Les potentiels redox des globules rouges mesurés dans notre étude correspondent donc à un état cellulaire de différenciation. Ce qui est plausible, car les globules rouges sont des cellules différenciées. Un raisonnement similaire s'applique au niveau du foie où les cellules hépatiques semblent être dans un état prolifératif (-260 à -210 mV). Ceci est probable puisque les animaux utilisés pour l'étude sont âgés de 3 jours de vie.

Toutefois, il faut rester conscient que la méthode utilisée pour permettre la détermination du statut et le potentiel redox du glutathion hépatique est faite à partir d'un homogénat hépatique. Par conséquent, le statut et le potentiel redox mesurés reflètent les processus cytoplasmiques et mitochondriaux de la cellule. Quatre-vingt-dix pourcent du glutathion se trouve au niveau cytoplasmique, alors qu'environ 10% est retrouvé au niveau mitochondrial (White et al, 1994). Sous condition de stress oxydant cytoplasmique, la concentration du glutathion sera diminuée avant la concentration mitochondriale puisque la majorité du glutathion est situé dans ce compartiment. Toutefois, si le stress oxydant est de

courte durée la concentration du glutathion mitochondrial ne sera pas affectée (Griffith, 1985) et par le fait même, il est fortement probable que le statut et potentiel redox resteront inchangés. Cependant, il y aura changement du statut et potentiel redox au niveau cytoplasmique. Puisque la méthode utilisée est faite à partir d'un homogénat tissulaire incluant les deux compartiments cellulaires, il se peut que le statut et potentiel redox trouvés soient sous- ou surestimés dû à l'atténuation entre les différences des deux compartiments. L'importance de la sous- ou surestimation est probablement mineure du fait que la concentration du glutathion se situe en grande majorité dans le cytosol.

4.2 PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX *IN VIVO*

Le laboratoire d'accueil ainsi que d'autres laboratoires ont documenté que les solutions de NP telles qu'administrées en clinique sont contaminées par des peroxydes (Bhatia et al, 1983 ; Brawley et al, 1993 ; Helbock et al 1993 ; Laborie et al, 1998 ; Lavoie et al, 1994 (b) ; Lavoie et al, 1997(b) ; Neuzil et al, 1995). Ces peroxydes contaminant les solutions intraveineuses de NP, peuvent causer une injure oxydante à l'organisme. Dans ce cas, il y aura débalancement en faveur des oxydants par rapport aux antioxydants d'où l'apparition d'un stress oxydant. Sachant que l'un des systèmes de défense contre cette source oxydante est le glutathion, nous croyons que l'établissement du statut et potentiel redox du couple redox GSSG/GSH est un bon marqueur du stress oxydant. Puisque plusieurs papiers rapportent que le statut redox cellulaire du glutathion influence l'activité de plusieurs protéines (Meng et al, 2002 ; Monteiro et al, 1996 ; Sen, 2000 ; Xu et al, 2002) et par conséquent, le cycle cellulaire (Hentze et al, 2003 ; Kirlin et al, 1999 ; Li et al, 2000 ; Schafer et al, 2001), nous avons voulu vérifier si la NP contaminée par les peroxydes étaient associée à une modification du statut et du potentiel redox du glutathion. Nous avons également voulu savoir si les complications hépatiques reliées à la nutrition parentérale, comme la cholestase et la stéatose étaient associées à une telle modification.

Les résultats majeurs du présent mémoire sont que la NP influence le potentiel redox du glutathion hépatique chez le modèle néonatal du cochon d'Inde. En fait, les composantes acides aminés-lipides de la NP ont un effet oxydant indépendant de leur

contenu en H_2O_2 . Mais il semble que cet effet soit associé à un processus radicalaire. De façon paradoxale, l'exposition à la lumière des solutions intraveineuses exerce un effet antioxydant. Cet effet est spécifique au foie puisqu'il n'est pas observé au niveau des globules rouges. Enfin, les résultats suggèrent que la cholestase et la stéatose ne sont pas influencées par une modification du statut redox du glutathion hépatique.

L'analyse statistique effectuée nous a permis d'établir que les composantes acides aminés-lipides de la NP ont un effet oxydant sur le statut redox lorsque comparés à la composante multivitaminée (figure 17 A). Cependant, l'effet lumière en présence d'acides aminés-lipides n'est concluant que pour le potentiel redox. Dans ce cas, le potentiel redox est significativement moins oxydant, le statut redox, quant à lui, ne présente qu'une tendance à la baisse. Néanmoins, si nous reprenons l'analyse statistique du statut redox de manière non factorielle pour observer l'effet lumière en présence ou en absence d'acides aminés-lipides, nous constatons un effet à la baisse significatif ($p < 0,05$) de la lumière en présence d'acides aminés-lipides. Cette nouvelle analyse statistique appuie l'effet noté sur le potentiel redox du glutathion. En fait, ceci affirme que l'exposition à la lumière des composantes acides aminés-lipides semble donc annuler l'effet oxydant de ce mélange lorsque protégé de la lumière. Nous ne pouvons pas dire s'il s'agit des acides aminés ou des lipides ou encore d'une interaction entre les deux, qui soit à l'origine de ce phénomène. Il serait éventuellement intéressant pour une prochaine étude d'en vérifier la cause.

Nous avons démontré dans notre modèle animal que l'exposition à la lumière de la NP a un effet antioxydant, toutefois, il ne peut s'agir d'un effet direct de la lumière, car lorsque la NP est rendue au niveau hépatique, elle n'est plus exposée à la lumière. De même, puisqu'il est connu que la lumière a des effets modificateurs sur les vitamines et les acides aminés (Bathia et al, 1980, 1991, 1993), il serait captivant de vérifier si ces métabolites modifiés stimulent ou modifient des antioxydants endogènes. Par exemple : différentes enzymes antioxydantes telles la superoxydes dismutase ou encore la glutathion peroxydase au niveau hépatique pourraient être modifiées. Toutefois, il ne semble pas que la glutathion réductase soit en cause puisque nos résultats ne démontrent pas d'effet de l'exposition à la lumière. Comme perspective d'avenir, il serait intéressant de vérifier si ces autres enzymes

s'opposent à l'effet oxydant de la NP. Les composantes de la NP modifiées par l'exposition à la lumière ont-elles un effet spécifique sur l'induction d'antioxydants endogènes ?

Par ailleurs, l'effet oxydant du tandem acides aminés-lipides de la NP en absence de lumière (figure 17 A et B) ne semble pas être dû aux peroxydes infusés avec l'alimentation parentérale. En effet, la concentration générée est de $101 \pm 5 \mu\text{M}$ et la concentration nécessaire pour induire un effet oxydant du H_2O_2 sur le statut et potentiel redox n'est observé seulement à une concentration supérieure à $200 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ (figure 20 A et B).

L'augmentation des isoprostanes par le H_2O_2 suggère que l'infusion de H_2O_2 induit la formation de radicaux libres. Par conséquent, l'effet réducteur de la lumière sur le 8-isoprostane $\text{F}_{2\alpha}$ suggère que celle-ci a un effet davantage antiradicalaire qu'antiperoxyde. Ces constatations nous mènent à une nouvelle hypothèse soit que les radicaux libres rendent plus oxydant le statut et potentiel redox du glutathion, suggérant que celui-ci soit secondaire à une peroxydation lipidique.

Cette hypothèse est vérifiée par l'effet antiradicalaire de la composante multivitaminée de la NP sur le H_2O_2 . L'interaction observée sur le statut et potentiel redox entre le H_2O_2 et les multivitamines suggère que les peroxydes soient transformés en radicaux libres. En fait, les multivitamines freinent l'effet des H_2O_2 et il est connu que celles-ci ont des propriétés antiradicalaires et n'interagissent pas avec les H_2O_2 (Lavoie et al, 1997 (b)). Nos résultats montrent que $500 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ a une influence quatre fois plus grande sur le statut redox hépatique par rapport au groupe recevant seulement la solution de base. Tandis qu'en présence de multivitamines l'effet oxydant du H_2O_2 est diminué de moitié (figure 21 A). Une altération similaire du statut redox cellulaire dans les cellules SMMC-7721 d'hépatome mises en présence de $200 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ a été remarqué par Li (Li et al, 2000). Ce qui suggère l'implication des molécules antiradicalaires telles les vitamines C et E contenues dans les multivitamines pour neutraliser le H_2O_2 devenu radicalaire. Shang a observé que les cellules épithéliales de cornée de lapin déplétées en GSH sont résistantes à une mort induite par le H_2O_2 lorsqu'elles sont pré-incubées avec de la vitamine C ou E (Shang et al, 2003).

L'augmentation du statut redox du groupe ayant reçu du H_2O_2 semble, en partie, être due à la baisse de l'activité de l'enzyme glutathion réductase. Cependant, ce n'est peut-être pas autant une baisse de l'activité de l'enzyme qu'une augmentation sous l'infusion de la solution intraveineuse de base. Il serait important de vérifier si l'activité de cette enzyme n'est pas affectée par les radicaux libres.

En absence de multivitamines, l'effet oxydant du H_2O_2 sur le potentiel redox ne semble pas être dû à une modification de la concentration en glutathion total. Il serait important de vérifier pourquoi le H_2O_2 infusé seul avec la solution de base n'augmente pas le niveau de glutathion alors qu'une élévation significative ($p < 0,05$) du glutathion total est constatée quand le H_2O_2 est infusé en présence de multivitamines (figure 22 B). Cette élévation du glutathion peut être causée par le H_2O_2 converti en radicaux libres qui n'a pu être contenu par les multivitamines, puisqu'il est connu que les radicaux libres stimulent la synthèse du glutathion (Shi et al, 1994 ; Warshaw et al, 1985). Par ailleurs, cette stimulation est rapportée au poumon du même modèle animal (Chessex et al, 1999). L'élévation du 8-isoprostane F_{2x} suite à l'infusion de H_2O_2 corrobore la génération de radicaux libres par le H_2O_2 ce qui est également constatée par d'autres (Chessex et al, 2002; Li et al, 2000). La relation positive entre la 8-isoprostane F_{2x} et le statut redox confirme l'hypothèse que le potentiel redox, modifié par la NP est influencé par la génération in situ de radicaux libres ou de produits de la peroxydation lipidique dans le modèle du cochon d'Inde âgé de 3 jours.

Par ailleurs, la comparaison des résultats obtenus par les 2 protocoles, soit celui étudiant l'impact des différentes composantes de la NP (figure 17) et celui démontrant l'influence antiradicalaire des multivitamines sur le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique (figure 21), nous aide à mieux déterminer s'il s'agit bien d'un processus radicalaire. Un groupe d'animaux dans chacun de ces deux protocoles, est infusé avec une solution de multivitamines contenant ou non du méta-bisulfite de sodium. Malgré la différence en peroxydes de ces deux solutions ($183 \pm 18 \mu M$ (figure 17) vs $4 \pm 2 \mu M$ (figure 21)), les valeurs du statut et potentiel redox restent les mêmes. Cette comparaison suggère que l'effet acides aminés-lipides sur le statut et potentiel redox est indépendant du contenu en H_2O_2 . La source de radicaux libres influençant le redox doit aussi provenir d'autres molécules, telles que les produits de la peroxydation lipidique.

Dans un autre ordre d'idées, il serait intéressant de mesurer si l'effet réducteur de l'exposition à la lumière est vraiment spécifique au foie et si le phénomène se retrouve dans d'autres organes par exemples le cerveau, le poumon ou encore au niveau du globule rouge. Même si la NP affecte de statut et potentiel redox du globule rouge, il n'y a pas d'effet de la lumière ni d'interaction significative démontrée entre les variables NP et l'exposition à la lumière des solutions intraveineuses sur le statut et potentiel redox (figure 19). Ceci suggère que l'interaction entre la NP et l'exposition à la lumière des solutions intraveineuses peut jouer un rôle spécifique sur la biologie/biochimie du foie. Cela ouvre un tout autre champ d'études.

Dans les différents protocoles effectués ci-dessus, nous avons tentés d'énumérer les facteurs pouvant expliquer les changements du statut et potentiel redox du glutathion cellulaire. Toutefois, il est pertinent de mentionner le rôle du statut métabolique cellulaire. En fait, le statut métabolique, fait référence à l'ensemble des réactions redox (oxydé/réduit) de la cellule telles que NAD/NADH, FAD/FADH et le NADP/NADPH. Bien que le rôle de la glutathion réductase fut mentionné ci-dessus, l'activité de cette enzyme sera déterminée en partie par la disponibilité de ces co-facteurs, entre autres, le NADPH. Les réactions dépendantes du ratio NADP/NADPH auront une influence potentielle sur le métabolisme du glutathion. En générales, le NADPH est formé des réactions anaboliques et est utilisé dans toutes les réactions de biosynthèse. Sa formation dépendra de la disponibilité des substrats pour les réactions utilisées pour sa génération. Si la G6PDH dans la voie des pentoses phosphate est déficiente, il en générera alors une diminution de NADPH puisqu'il est important au niveau hépatique pour le recyclage du GSSG en GSH. Par le fait même, il pourrait y avoir augmentation du stress oxydant, donc du statut et potentiel redox du glutathion dû au manque du NADPH (Izawa et al, 1998; Kletzien et al, 1994). Toutefois, la cellule possède d'autres enzymes permettant la formation du NADPH donc ce n'est pas le facteur limitant. La compétition du NADPH pour les réactions utilisant comme co-facteur est plutôt le facteur limitant. Par exemple, au niveau de la mitochondrie le NADPH a un rôle dans le contrôle de la capacité antioxydante pour le recyclage du glutathion ainsi que dans le métabolisme énergétique. Si le NADPH est utilisé en plus grande majorité pour le métabolisme énergétique, donc au détriment de la capacité

antioxydante et qu'il y a une injure oxydante, la capacité antioxydante en sera affaiblie. Il est possible que nous observions un stress oxydant. Il faut rester conscient que nous pouvons constater dans cette étude, un statut et potentiel redox du glutathion plus oxydant dû à une redistribution du NADPH cellulaire. Il serait alors important dans une prochaine étude de vérifier le ratio du NADPH/NADP ainsi que l'activité des enzymes qui le forme.

Saisissant l'opportunité que le laboratoire était aussi intéressé à l'association entre la NP et les complications hépatiques, l'intérêt secondaire de l'étude était également de vérifier si une modification du statut redox était corrélée avec une cholestase ou une la stéatose.

Nos travaux n'ont pas permis de démontrer une association entre la stéatose et le statut redox (figure 25 et 26). La littérature suggère que le stress oxydant serait secondaire à une cholestase, nous observons également le même phénomène, car la première heure du débit biliaire exprimé en $\mu\text{L}/\text{min}/\text{g}$ foie indique qu'environ 27% du débit biliaire est influencé par le stress oxydant de la NP. L'étendue du statut redox des groupes est grande, soit d'environ 2 à 12 % ce qui permet de vérifier s'il y a une relation ou non. Cependant, l'absence de corrélation entre la deuxième heure du débit biliaire et le statut redox lorsque le débit est exprimé en fonction de 100 g de poids corporel, suggère que la signification du $r^2=0,27$ soit une erreur de type alpha ($\alpha=0,05$). Ceci est supporté par le fait que dans cette corrélation, l'accroissement du débit biliaire est proportionnel à l'augmentation du stress oxydant, ce qui est contraire à l'hypothèse de départ. Il se peut que le mode d'expression utilisé pour exprimer de débit biliaire ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{g}$ foie) ne soit pas le meilleur. En effet, la NP selon l'apport calorique fourni modifie le poids du foie (données non rapportées). Il serait préférable d'exprimer le débit biliaire en fonction du nombre de cellules ou encore, de l'exprimer en fonction de l'ADN dans ces conditions expérimentales. Ce mode d'expression permettrait de ne pas tenir compte du contenu du foie comme l'accumulation de triglycérides ou encore de tenir compte du poids du foie dû à des plus grosses cellules.

Ce présent mémoire nous démontre que la NP module le statut redox du glutathion et dans l'article soumis *The TPN-related reduction in bile flow is independent of oxidant load and parenteral multivitamins* dont je suis coauteur, nous avons mis en évidence ce phénomène et également que le débit biliaire est également influencé par la NP. Cependant, le déséquilibre

entre les oxydants et les antioxydants n'est pas l'évènement initial de la formation de la cholestase. Le manque de corrélation entre la cholestase et le stress oxydant chez des rats (179-278 g) nourris par voie parentérale est également rapporté par Belli et collaborateurs (Belli et al, 2003). Récemment, Weinberger confirmait ce fait chez les nouveau-nés prématurés recevant une NP, en documentant une absence de corrélation entre la bilirubine plasmatique, et les TBARS urinaires (Weinberger et al, 2002). Tout ceci suggère qu'une modification du statut redox du glutathion par la NP ne soit pas l'étape principale menant aux complications hépatobiliaires, mais serait secondaire aux complications. Une autre piste qui pourrait être investiguée est celle des acides aminés modifiés par l'exposition à la lumière, car plusieurs tentent de démontrer que ceux-ci auraient un rôle à jouer dans la cholestase (Bathia et al, 1983, 1991, 1993 ; Shattuch et al, 1995). De plus, nous avons démontré dans le papier cité plus haut, que c'est lors de l'ajout des acides aminés qu'il y a une chute du débit biliaire.

En résumé, dans cette étude, nous avons démontré, que la NP influence le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique; et que les complications hépatiques reliées à la NP, cholestase et stéatose, ne sont pas associées à une modification du statut redox du glutathion hépatique. Afin d'affirmer qu'il existe une association entre la NP et le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique, nous avons établi d'une part que l'électrophorèse capillaire est une excellente méthode pour la détermination du glutathion sous sa forme réduite et oxydée, d'autre part, que 1) la nutrition parentérale influence le statut ainsi que le potentiel redox du glutathion hépatique; 2) le pouvoir oxydant de la nutrition parentérale semble être dû aux radicaux libres; 3) l'exposition des solutions intraveineuses à la lumière a un effet antioxydant surprenant sur les acides aminés-lipides qui eux ont un effet oxydant; 4) l'effet protecteur de l'exposition à la lumière de la solution intraveineuse de NP est spécifique au foie par rapport aux globules rouges. Cependant, nous ne pouvons affirmer avec certitude que l'exposition à la lumière des solutions d'alimentation parentérale est bénéfique pour enrayer ou diminuer le stress oxydant causé par les solutions de nutrition parentérale.

Par ce présent mémoire, nous démontrons qu'au niveau du modèle animal néonatal de NP que le statut et potentiel redox du glutathion au niveau du foie et du globule rouge

sont modifiés. Il serait important de vérifier si le même phénomène se produit chez les bébés nourris par NP, même s'il faut rester conscient qu'il est difficile au point de vue éthique de prélever du sang d'un nouveau-né prématuré. En fait, comme l'enfant reçoit bien souvent dans les premiers jours de vie une solution de dextrose et de multivitamines, et que ce n'est que quelques jours plus tard que survient l'ajout d'acides aminés et de lipides, il serait intéressant de mesurer le statut et potentiel redox du glutathion sanguin à ces deux niveaux de NP. Si le statut et potentiel redox sanguin du bébé étaient changés cela indiquerait que ce dernier n'a pas contenu la charge oxydante de la NP. Il est plausible de croire que différentes complications de la prématurité peuvent être causées par la NP due à la modification du potentiel redox. Il serait bien de regarder d'autres complications associées à un stress oxydant de la NP comme des problèmes pulmonaires, de l'œil ou encore du cerveau. Cependant, au niveau du foie, il ne semble pas y avoir de relation entre la cholestase/stéatose et le statut redox du glutathion.

5. RÉFÉRENCES

Allard JP. Other disease associations with non-alcoholic fatty disease (NAFLD). *Best Pract Res Clin Gasroenterol* 16: 783-95, 2002.

Alptekin N, Mehmetçik G, Uysal M and Aykaç-Toker G. Evidence for oxidative stress in the hepatic mitochondria of bile duct ligated rats. *Pharmacol Res* 36: 243-247, 1997.

Arrigo AP. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med* 27: 936-944, 1999.

Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG and Neuschqander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinique entity. *Gastroenterology* 107: 1103-1109, 1994.

Ballatori N and Clarkson TN. Developmental changes in the biliary excretion of methylmercury and glutathion. *Science* 216:61-63, 1982.

Ballatori N and Truong AT. Relation between biliary glutathione excretion and bile acid-independent bile flow. *Am J Physiol* 256: G22-G30, 1989.

Baker AL and Rosenberg IH. Hepatic complications of total parenteral nutrition. *Am J Med* 82: 489-497, 1987.

Bánhegyi G, Braun L, Csala M, Puskas F and Mandl J. Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free Radic Biol Med* 23: 793-803, 1997.

Barvick KW and Rosai J. Liver. In: *Ackerman's Surgical Pathology* (7thed), edited by Rosai J, The C.V. Mosby Compagny, USA, 1989, vol. 1, p. 675-735.

Beale EF, Nelson RM, Bucciarelli RL, Donnelly WH and Eitzman DV. Intrahepatic cholestasis associated with parenteral nutrition in premature infants. *Pediatrics* 64: 342-347, 1979.

Belli DC, Albrecht R, La Scala GC, Desjeux JF and Pelissier MA. Homocysteine prevent total parental nutrition (TPN)-induced cholestasis whitout change in hepatic oxidative stress in the rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 36: 200-205, 2003.

Benedetti A, Comporti M and Esterbauer H. Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxydation of liver microsomal lipids. *Biochim Biophys Acta* 620: 281-296, 1980.

Bhatia J, Mims LC and Roesel A. The effect of phototherapy on amino acid solutions containing multivitamins. *J Pediatr* 96: 284-286, 1980.

Bhatia J, Stegink LD and Ziegler EE. Riboflavine enhances photo-oxidation of amino acids under simulated clinical conditions. *J Parenteral Enteral Nutr* 7: 277-279, 1983.

Bhatia J, Rassin DK and McAdoo DJ. Photosensitized oxidation of tryptophan: effect on liver and brain tryptophan. *J Parenteral Enteral Nutr* 15: 637-641, 1991.

Bhatia J, Moslen MT, Haque AK, McCleery R and Rassin DK. Total parenteral nutrition-associated alterations in hepatobiliary function and histology in rats: is light exposure a clue? *Pediatr Res* 33: 487-492, 1993.

Blessum C, Jeppsson JO, Aguzzi F, Bernon H et Bienvenu J. L'électrophorèse capillaire : principe et application au laboratoire de biologie clinique. *Ann Biol Clin* 57: 643-657, 1999.

Boelhouwer RU, King WWK, Kingsnorth AN, Weening JJ, Young VR and Malt RA. Fat-based (Intralipid 20%) versus carbohydrate-based total parenteral nutrition: effects on hepatic structure and function in rats. *J Parenteral Enteral Nutr* 7: 530-533, 1983.

Brawley V, Bhatia J and Karp WB. Hydrogen peroxide generation in a model paediatric parenteral amino acid solution. *Clin Sci* 85: 709-712, 1993.

Brawley V, Bhatia J and Karp WB. Effet of sodium metabisulfite on hydrogen peroxide production in light-exposed pediatric parenteral amino acid solutions. *Am J Health-Syst Pharm* 55:1288-1292, 1998.

Btaiche IF and Khalidi N. Parenteral nutrition-associated liver complications in children. *Pharmaco* 22: 188-211, 2002.

Burt AD, Mutton A and Day CP. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diag Pathol* 15: 246-258,1998.

Cappiello M, Del Corso A, Camici M and Mura U. Thiol and disulfide determination by free zone capillary electrophoresis. *J Biochem Biophys Met* 26: 335-341, 1993.

Carru C, Zinellu A, Mario Pes G, Marongiu G, Tadoline B and Deiana L. Ultrarapid capillary electrophoresis method for the determination of reduced and oxidized glutathione in red blood cells. *Electrophoresis* 23: 1716-1721, 2002.

Chaib S, Charrueau C, Neveux N, Coudray-Lucas C, Cynober L and De Bandt JP. Isolated perfused liver model: the rat and guinea pig compared. *Nutrition* 20: 458-464, 2004.

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

Chessex P, Lavoie JC, Laborie S and Rouleau T. Parenteral multivitamin supplementation induces both oxidant and antioxisant responses in the liver of newborn guinea pigs. *J Parenteral Gastroenterol Nutr* 32: 316-321, 2001.

Chessex P, Lavoie JC, Rouleau T, Brochu P, St-Louis P, Lévy E and Alvarez F. Photooxidation of parenteral multivitamins induced hepatic steatosis in neonatal guinea pig model of intravenous nutrition. *Pediatr Res* 52: 958-963, 2002.

Chitturi S and Farrell GC. Ethiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 21: 27-41, 2001.

Clive DR and Greene JJ. Cooperation of protein disulfide isomerase and redox environment in the regulation of NF- κ B and AP1 binding to DNA. *Cell Biochem Funct* 14:49-55, 1996.

Cracowski JL, Stanke-Labesque F, Bessard G. Isoprostanes: nouveaux marqueurs du stress oxydant. Aspects fondamentaux et cliniques. *Rev Méd Interne* 21: 304-307, 2000.

Day CP and James OFW. Steatohepatitis: atale of two "hits"? *Gastroenterology* 114: 882-885, 1998.

Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): where are we now and where are we going? *Gut* 50: 585-588, 2002.

Diehl AM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 19: 221-229, 1999.

Duerksen DR, Van Aerse JE, Chan G, Thomson ABR, Jewell LJ and Clandinin MT. Total parenteral nutrition impairs bile flow and alters bile composition in newborn piglet. *Dig Dis Sci* 41:1864-1870, 1996.

Ercal N, Le K, Treeratphan P and Matthews R. Analysis of thiol-containing compounds in biological samples by capillary zone electrophoresis. *Biomed Chromatogr* 10: 15-18, 1996.

Erlinger S. Mecanisms of hepatic transport and bile secretion. *Acta Gastroenterol Belg* 59: 159-162, 1996.

Ernst JA and Gross SJ. Type and méthode of feeding for infants In: *Fetal and Neonatal Physiology* (2nded.), edited by Polin RA and Fox WW, WB Saunders Compagnie, USA, 1998, vol. 1, p. 363-383.

Esterbauer H, Schaur RJ and Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11: 81-128, 1991.

Farrell MK and Bucuvalas JC. Systemic disease and the liver. In: *Liver Disease in Children* (2nded), edited by Suchy FJ, Sokol RJ, Balistreri WF, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, p.869-897, 2001.

Fong DG, Nehra V, Kindor KD and Buchman AL. Metabolic and nutritional considerations nonalcoholic fatty liver. *Hepatology* 32: 3-10, 2000.

Garcia-Alfonso C, Martinez-Galisteo E, Llobell A, Barcena JA and Lopez-Barea J. Regulation of horse-liver glutathione reductase *Int J Biochem* 25: 513-520, 1993.

Geigy Documenta, Scientific Tables, (3thed.), edited by Diem K and Lentner C, Geigy Pharmaceuticals, Canada, 1973, p.613.

Gibson JB and Berry GT. Pathology of metabolic disease of the liver. In: Fetal and Neonatal Physiology (3thed.), edited by Polin RA, Fox WW and Abman S, WB Saunders Compagnie, USA, 2004, vol. 2, p.1211-1218.

Gilbert HF, McLean V and McLean Marrs. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Rel Areas Mol Biol* 63:69-172, 1990.

Girotti AW. Mecanisme of lipid peroxidation. *J Free Radic Biol Med* 1: 87-95, 1985.

Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems *J Lipid Res* 39: 1529-1542, 1998.

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

Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 27: 922-935, 1999.

Gutteridge JMC and Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 15: 129-135, 1990.

Hall RI, Grant JP, Ross LH, Coleman RA, Bozovic MG and Quarfordt SH. Patholognesis of hepatic steatosis in the parenterally fed rat. *J Clin Invest* 74: 1658-1668, 1984.

Halliwell B and Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280: 1-8, 1990.

Halliwell B, Gutteridge JMC and Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 119: 598-620, 1992.

Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet* 344(10): 721-724, 1994.

Halliwell B. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Rad Res* 25:439-454, 1996.

Halliwell B, Clement MV and Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS* 486: 10-13, 2000.

Halliwell B. Vitamin C and genomic stability. *Mutat Res* 475: 29-35, 2001.

Helbock HJ, Motchnik PA and Ames BN. Toxic hydroperoxides in intraveunous lipid emultion used in preterm infants. *Pediatrics* 91: 83-87, 1993.

Hentze H, Latta M, Künstle G, Lucas R and Wendel A. Redox control of hepatic cell death. *Toxicol Lett* 139: 111-118, 2003.

Heyman MB, Tseng H-C and Thaler MM. Total parenteral nutrition (TPN) decreases hepatic glutathione (GSH) concentration in weanling rats. *Abstract Hepatology* 4: 1049, 1984.

Horst DA and Karpen SJ. Bile Formation and Cholestasis. In: *Fetal and Neonatal Physiology* (3rd ed.), edited by Polin RA, Fox WW and Abman S, WB Saunders Compagnie, USA, 2004, vol. 2, p.1186-1198.

Huang CS, Chang LS, Anderson ME and Meister A. Catalytic and regulation properties of the heavy subunit of rat kidney γ -glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* 268: 19675-19680, 1993.

Huang HY, Appel LJ, Croft KD, Miller III ER, Mori TA and Puddey IB. Effect of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxydation: results of a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 76: 549-555, 2002.

Imai H and Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* 34:145-169, 2003.

Izawa S, Maeda K, Miki T, Mano J, Inoue U and Kimura A. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptive response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 330:811-817, 1998.

Jacobs DO, Settle G, Trerotola SO, Albina JE, Wolf GL and Rombeau JL. Detection of total parenteral nutrition-induced fatty liver infiltration in the rat by in vitro proton nuclear magnetic resonance. *JPEN J Parenteral Enteral Nutr* 10: 177-183, 1986.

Jones DP, Carlson JL, Mody VCJ, CAL J, Lynn MJ and Sternberg PJ. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med* 28: 625-635, 2000.

Jones DP. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Meth Enzymo* 38:93-113, 2002.

Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC, Kannan R, Garcia-Ruiz C, Ookhtens M and Yi JR. GSH transporters: molecular characterization and role in GSH homeostasis. *Biol Chem* 377: 267-273, 1996.

Keim NL. Nutritional effectors of hepatic steatosis induced by parenteral nutrition in rat. *JPEN J Parenteral Enteral Nutr* 11: 18-22, 1987.

Kelly DA. Liver complications of pediatric parenteral nutrition-epidemiology. *Nutrition* 14: 153-157, 1998.

Kim H, Kirschenbaum LJ, Rosenthal I and Riesz P. Photosensitized formation of ascorbate radicals by riboflavin: an *in vitro* study. *Photochem Photobiol* 57: 777-784, 1993.

Kirlin WG, Cai J, Thompson SA, Diaz D, Kavanagh TJ and Jones DP. Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers. *Free Radic Biol Med* 27: 1208-1218, 1999.

Kletzien RF, Harris PKW and Foellmi LA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: "a housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J* 8:174-181, 1994.

Laborie S, Lavoie JC, and Chessex P. Paradoxical role of ascorbic acid and riboflavin in solutions of total parenteral nutrition: implication in photoinduced peroxide generation. *Pediatr Res* 43: 601-609, 1998.

Laborie S, Lavoie JC, Pineault M, Chessex P. Protecting solutions of parenteral nutrition from peroxidation. *J Parenteral Enteral Nutr* 23: 104-109, 1999.

Laborie S, Lavoie JC, and Chessex P. Increased urinary peroxides in newborn infants receiving parenteral nutrition exposed to light. *J Pediatr* 136: 628-632, 2000 **(a)**.

Laborie S, Lavoie JC, Pineault M and Chessex P. Contribution of multivitamins, air, and light in the generation of peroxides in adult and neonatal parenteral nutrition solutions. *Ann Pharmacother* 34: 440-445, 2000 **(b)**.

Laborie S, Lavoie JC, Rouleau T and Chessex P. Multivitamin solutions for enteral supplementation: a source of peroxides. *Nutrition* 18: 470-473, 2002.

Lang CA, Mills BJ, Mastropaolo W and Liu MC. Blood glutathione decreases in chronic diseases. *J Lab Clin Med* 135:402-405, 2000.

Lavoie JC and Chessex P. Biologic effects of parenteral bisulfite on human vascular tissue. *Pediatr Res* 33: 347-351, 1993.

Lavoie JC and Chessex P. Gender-related response to a tert-butyl hydroperoxide-induced oxidation in human neonatal tissue. *Free Radic Biol Med* 16: 307-313, 1994 **(a)**.

Lavoie JC, Lachance C and Chessex P. Antiperoxide activity of sodium metabisulfite: a double-edged sword. *Biochem Pharmacol* 47: 871-876, 1994 **(b)**.

Lavoie JC and Chessex P. Gender and maturation affect glutathione status in human neonatal tissues. *Free Radic Biol Med* 26: 648-657, 1997 **(a)**.

Lavoie JC, Bélanger S, Spalinger M, Chessex P. Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition: the major contributor to in vitro generation of peroxides. *Pediatrics* 99: E61-E70, 1997 **(b)**.

(URL: <http://www.pediatrics.org/cgi/content/full/99/3/e6>)

Lavoie JC, Chessex P, Gauthier C, Levy E, Alvarez F et Rouleau. The TPN-related reduction in bile flow is independent of oxidant load and parenteral multivitamins. *soumis au J Pediatr Gastroenterol Nutr* juillet 2004.

Lepage G, Munoz G, Champagne J and Roy CC. Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 197: 277-283, 1991.

Levy EJ, Anderson ME, Meister A. Transport of glutathione dithyl ester into human cells. *Proc Natl Acad Sci* 90:9171-9175, 1993.

Li J, Huang CY, Zheng RL, Cui KR and Li JF. Hydrogen peroxide induced apoptosis in human hepatoma cells and alters cell redox status. *Cell Biol Int* 24: 9-23, 2000.

Liu TZ, Stern A and Morrow JD. The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *J Biomed* 5: 415-420, 1998.

Liu W, Kato M, Akhand AA, Hayakawa A, Suzuki H, Miyata T, Kurokawa K, Hotta Y, Ishikawa N and Nakashima I. 4-hydroxynonenal induced a cellular redox status-related activation of the cascade for apoptotic cell death. *J Cell Sci* 113: 635-641, 2000.

Long LH, Evans PJ and Halliwell B. Hydrogen peroxide in human urine: implications for antioxidant defense and redox regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 262: 605-609, 1999.

Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J* 13:1169-1183, 1999.

Lykkesfeldt J. Increased oxidative damage in vitamin C deficiency is accompanied by induction of ascorbic acid recycling capacity in young but not mature guinea pigs. *Free Radical Res* 36: 567-574, 2002.

Manuel-y-Keenoy B, Nonneman L, De Bosscher H, Vertommen J, Schrans S, Klütsch K and De Leeuw I. Effects of intravenous supplementation with α -tocopherol in patients receiving total parenteral nutrition containing medium- and long-chain triglycerides. *Eur J Clin Nutr* 56: 121-128, 2002.

Massarenti P, Biasi F, De Francesco A, Pauletto D, Rocca G, Silli B, Vizio B, Serviddio G, Leonarouzzi G, Poli G and Palmo A. 4-hydroxynonenal is markedly higher in patients on a standard long-term home parenteral nutrition. *Free Radic Res* 38: 73-80, 2004.

May JM and De Haën C. The insulin-like effect of hydrogen peroxide on pathways of lipid synthesis in rat adipocytes. *J Biol Chem* 254: 9017-9021, 1979.

Meguid MM, Chen TY, Yang ZJ, Campos ACL, Hitch DC and Gleason JR.. Effects of continuous graded total parenteral nutrition on feeding indexes and metabolic concomitants in rats. *Am J Physiol* 260: E126-E140, 1991.

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

Meister A. New aspect of glutathione biochemistry and transport: selective alteration of glutathione metabolism. *Fed Proc* 43: 3031-3042, 1984.

Meister A. Glatathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 263: 17205-17208, 1988.

Meister A. Gluthione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem* 269: 9397-9400, 1994 (a).

Meister A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res* 54: 1969s-1975s, 1994 (b).

Meng TC, Fukada T and Tonks NK. Reversible oxidation and inactivation of protin tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell* 9(2): 387-399, 2002.

Merritt RJ. Cholestasis associated with total parenteral nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 5: 9-22, 1986.

Meyer M, Pahl HL and Baeuerle PA. Regulation of the transcription factor NF- κ B and AP-1 by redox changes. *Chem Biol Interact* 91: 91-100, 1994.

Mills BJ, Richie JP, Lang CA. Glutathione disulfide variability in normal human blood. *Anal Biochem* 222:95-101, 1994.

Mohan P, Ling SCL and Watkins JB. Ontogeny of hepatobiliary secretion: role of glutathione. *Hepatology* 19: 1504-1512, 1994.

Monteiro HP and Stern A. Redox modulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways. *Free Radic Biol Med* 21: 323-333, 1996.

Moore K and Roberts II LJ. Measurement of lipid peroxidation. *Free Rad Res* 28: 659-671, 1998.

Morán D, González De Buitrago JM, Fernández E, Galán AI, Muñoz ME and Jiménez R. Inhibition of biliary glutathione secretion by cyclosporine A in the rat: possible mechanisms and role in the cholestasis induced by the drug. *J Hepatol* 29: 68-77, 1998.

Morrow JD and Roberts LJ. The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res* 36: 1-21, 1997.

Moss RJ, Haynes AL, Pastuszyn A and Glew RH. Methionine infusion reproduces liver injury of parenteral nutrition cholestasis. *Pediatr Res* 45: 664-668, 1999.

Muscari C, Pappagallo M, Ferrari D, Giordano E, Capanni C, Caldarera CM and Guarnieri C. Simultaneous detection of reduced and oxidized glutathione in tissues and mitochondria by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B* 707: 301-307, 1998.

Nakagawa M, Hiramatsu Y, Mitsuyoshi K, Yamamura M, Hioki Koshiro and Masakatsu Y. Effect of various lipid emulsions on total parenteral nutrition-induced hepatosteatosis in rat. *JPEN J parenter Enteral Nutr* 15: 137-143, 1991.

Narkewicz MR. Neonatal cholestasis: pathophysiology, etiology and treatment. In: *Fetal and Neonatal Physiology* (3thed.), edited by Polin RA, Fox WW and Abman S, WB Saunders Compagnie, USA, 2004, vol. 2, p.1218-1221.

Neuzil J, Darlow BA, Inder TE, Sluis KB, Winterbourn CC and Stoker R. Oxidation of parenteral lipid emulsion by ambient and phototherapie lights: potential toxicity of routine parenteral feeding. *J Pediatr* 126: 785-90, 1995.

Nightingale JMD. Hepatobiliary, renal and bone complications of intestinal failure. *Best Prat Res Clin Gastro* 17: 907-929, 2003.

Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J and Wolff SP. Measurement of plasma hydroperoxide concentration by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem* 220: 403-409, 1994.

Parola M, Leonarduzzi G, Robino G, Albano E, Poli G and Dianzani MU. On the role lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis. *Free Rad Biol Med* 20: 351-359, 1996.

Peden VH, Witzleben Cl, Skelton MA. Total parenteral nutrition. *J Pediatr* 78: 180-181, 1971.

Pironi L, Ruggeri E, Zolezzi C, Savarino L, Incasa E, Belluzzi A, Munarini A, Piazza S, Tolomelli M, Pizzoferrato A and Miglioli M. Lipid peroxidation and antioxidant status in adults receiving lipid-based home parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr* 68: 888-893, 1998.

Pitkänen O, Hallman, Anderson S. Generation of free radicals in lipid emulsion used in parenteral nutrition. *Peadiatre Res* 29: 56-59, 1991.

Postuma R and Trevenen CL. Liver disease in infants receiving total parenteral nutrition. *Pediatr Res* 63: 110-115, 1979.

Praticò D. F₂-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo. *Atherosclerosis* 147: 1-10, 1999.

Praticò D, Lawson JA, Rokach J and FitzGerald GA. The isoprostanes in biology and medicine. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 12, 2001.

Quigley EMM, Marsh MN, Shaffer JL and Markin R. Hepatobiliary complications of total parenteral nutrition. *Gastroenterology* 104: 286-301, 1993.

Rahman I and NacNee W. Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Radic Biol Med* 28: 1405-1420, 2000.

Rao MS and Reddy JK. Peroxisomal β -oxydation and steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 21: 43-55, 2001.

Reed DJ. Regulation of reductive processes by glutathione. *Biochem Pharmacol* 35:7-13, 1986.

Reif S, Tano M, Oliverio R, Young C and Rossi T. Total parenteral nutrition-induced steatosis: reversal by parenteral lipid infusion. *J Parenteral Enteral Nutr* 15: 102-104, 1991.

Rickett GMW and Kelly FJ. Developmental expression of antioxidant enzymes in guinea pig lung and liver. *Development* 108, 331-336, 1990.

Robert F, Bouilloux JP et Denoroy L. L'électrophorèse capillaire : principe et applications. *Ann Biol Clin* 49: 137-148, 1991.

Roberts II LJ and Morrow JD. Measurement of F_2 -isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med* 28: 505-513, 2000.

Robinson MK, Ahn MS, Rounds JD, Cook JA, Jacobs DO and Wilmore DW. Parenteral glutathione monoester enhances tissues antioxidants store. *JPEN* 16:413-418, 1992.

Sax HC, Talamini MA, Brackett K and Fischer JE. Hepatic steatosis in total nutrition: failure of fatty infiltration to correlate with abnormal serum hepatic enzyme levels. *Surgery* 100: 697-702, 1986.

Schafer FQ and Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30: 1191-1212, 2001.

Sen CK. Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr Top Cell Regul* 36: 1-30, 2000.

Serru V, Baudin B, Ziegler F, David JP, Cals MJ, Vaubourdolle M and Mario N. Quantification of reduced and oxidized glutathione in whole blood samples by capillary electrophoresis. *Clin Chem* 47: 1321-1324, 2001.

Shang F, Lu M, Dudek E, Reddan J and Taylor A. Vitamin C and Vitamin E restore the resistance of GSH-depleted lens cells to H_2O_2 . *Free Rad Biol Med* 34: 521-530, 2003.

Shattuck KE, Bathia J, Grinnell C and Rassin DK. The effects of light exposure on the in vitro hepatic response to an amino acid-vitamin solution. *J Parenteral Enteral Nutr* 19:398-420, 1995.

Shi MM, Iwamoto T and Forman HJ. γ -glutamylcysteine synthetase and GSH increase in quinone-induced oxidative stress in BPAEC. *Am J Physiol* 247: L414-L421, 1994.

Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 27: 916-921, 1999.

Silvers KM, Dralow BA, Winterbourn CC. Lipid peroxide and hydrogen peroxide formation in parenteral nutrition solutions containing multivitamins. *J Parenteral Enteral Nutr* 25: 14-17, 2001.

Sokol RJ, Devereaux M and Khandwala RA. Effect of dietary lipid and vitamin E on mitochondrial lipid peroxidation and hepatic injury in the bile duct-ligated rat. *J Lipid Res* 32:1349-1357, 1991.

Sokol RJ, Devereaux M, Khandwala R and O'Brien K. Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acids toxicity to isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 17: 869-881, 1993.

Sokol RJ, Taylor SF, Devereaux MW, Khandwala R, Sondheimer NJ, Shikes RH and Mierau G. Hepatic oxidant injury and glutathione depletion during total parenteral nutrition in weanling rats. *Am J Physiol* 270: G691-G700, 1996.

Srivastava SK and Beutler E. Accurate measurement of oxidized glutathione content of human, rabbit, and rat red blood cells and tissues. *Anal Biochem* 25:70-75, 1968.

Stempak D, Dallas S, Bendayan R, Koren G and Baruchel S. Glutathione stability whole blood: effects of various deproteinizing acids. *Ther Drug Monit* 23: 542-549, 2001.

Sun Y and Oberley LW. Redox regulation of transcriptional activators. *Free Rad Biol Med* 21: 335-348, 1996.

Teitelbaum DH and Tracy T. Parenteral nutrition-associated cholestasis. *Semin Pediatr Surg* 10: 72-80, 2001.

Touloukian RJ and Seashore JH. Hepatic secretory obstruction with total parenteral nutrition in the infant. *J Pediatr Surg* 10: 353-360, 1975.

Tulikoura I and Huikuri K. Morphological Fatty Changes and Function of the liver, serum free fatty acids, and triglycerides during parenteral nutrition. *Scand J Gastroenterol* 17: 177-185, 1982.

Warshaw JB, Wilson CW, Saito K and Prough RA. The responses of glutathione and antioxidant enzymes to hyperoxia in developing lung. *Pediatr Res* 19: 819-823, 1985.

Watkins JB, Szcapanick P, Gould JB, Klein P and Lester R. Bile Salt metabolism in the human premature infant. *Gastroenterology* 69:706-713, 1975.

Weinberger B, Watorek K, Strauss R, Witz G, Hiatt M and Hegyi T. Association of lipid peroxidation with hepatocellular injury in preterm infants. *Crit Care* 6: 521-525, 2002.

White AC, Thannickal VJ and Fanburg BL. Glutathione deficiency in human disease. *J Nutr Biochem* 5: 218-226, 1994.

Winkler BS, Orselli SM and Rex TS. The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective. *Free Rad Biol Med* 17: 333-349, 1994.

Worthington DJ and Rosemeyer MA. Human glutathione reductase: purification of the crystalline enzyme from erythrocytes. *Eur J Biochem* 48: 167, 1974.

Xu D, Rovira II and Finkel T. Oxidants painting the cysteine chapel: redox regulation of PTPs. *Dev Cell* 2: 251-259, 2002.

Yang Y, Sharma R, Sharma A, Awasthi S and Awasthi Y. Lipid peroxydation and cell cycle signalling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signalling. *Acta Biochim Pol* 50: 319-336, 2003.

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