

2711.3293.5

Université de Montréal

Association entre les produits issus de la dégradation de la vitamine C, dépendante du  $H_2O_2$ , et le métabolisme des lipides hépatiques.

Par

Laurent Knafo

Programme de sciences biomédicales

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

Avril, 2005

© Laurent Knafo, 2005  
Université de Montréal



W

4

U58

2005

V. 116

## **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.

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Association entre les produits issus de la dégradation de la vitamine C, dépendante du  $H_2O_2$ , et le métabolisme des lipides hépatiques.

présenté par :

Laurent Knafo

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Pierre Hardy : Président-rapporteur

Dr Jean-Claude Lavoie : Directeur de recherche

Dr Richard Wagner : Membre du jury

## ABRÉGÉ

**Introduction :** La perfusion chez le cochon d'Inde nouveau-né de solutions de multi-vitamines (MV), exposées à la lumière, induit un foie gras. On observe la génération de  $H_2O_2$  dans des mélanges d'acide ascorbique (AA) et de riboflavine (Rf) photo-excitée ainsi que des molécules de masse 136 et 208 identifiées par spectrométrie de masse. **Hypothèse :** le  $H_2O_2$  initie la peroxydation de l'AA et la génération de sous-produits biologiquement actifs pouvant affecter le métabolisme des lipides hépatiques. **Les objectifs :** évaluer le rôle du  $H_2O_2$  dans la génération de ces molécules et comprendre comment elles influencent le métabolisme des lipides hépatiques en mesurant l'activité de 3 enzymes régulatrices. **Méthodes :** c'est par la spectrométrie de masse que nous avons documenté le rôle du  $H_2O_2$  et de la Rf photo-excitée dans la formation des produits de dégradation de l'AA. Seize cochons d'Inde ont reçu pendant 4 jours des solutions parentérales (5% dextrose, 0.45% NaCl, 1U/ml héparine) supplémentées avec des mélanges de AA et de Rf. Le mélange contrôle est demeuré protégé de la lumière pour éviter la formation de ces molécules tandis que le mélange expérimental est exposé à la lumière pour favoriser leur formation. Dans le foie, les activités de l'acétyl coenzymeA-carboxylase (ACC), la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), la triacylglycérol hydrolase (THG) ainsi que le redox ont été mesurés après 4 jours, de même que les triglycérides (TG) hépatiques et plasmatiques. Les urines ont été analysées par spectrométrie de masse. **Résultats :** la formation des molécules 136 et 208 dépend du  $H_2O_2$ , lui-même dépendant du temps et de la lumière. L'ACC des animaux recevant les solutions expérimentales est stimulée tandis que l'AMPK et la TGH sont plus stimulées par des concentrations plus élevées de vitamine C. Ces derniers ont des niveaux de TG plus faibles et un redox plus élevé. **Conclusions :** le  $H_2O_2$  induit la dégradation de l'AA en sous-produits potentiellement hépato-toxiques. Nous avons suggéré que ces molécules possèdent des fonctions peroxydes et aldéhydes. **Mots clés :** Nutrition parentérale, dégradation peroxydative de la vitamine C, riboflavine photo-excitée, métabolisme des lipides, spectrométrie de masse.

## ABSTRACT

**Introduction:** Perfusion of multivitamin preparations (MVP) induce a fatty liver in newborn guinea pigs that can be prevented by photo-protection. Ascorbic acid (AA), in the presence of photo-excited riboflavin, generates  $H_2O_2$  and molecules with masses of 136 and 208, the most abundant identified by mass spectrometry. We **hypothesize** that  $H_2O_2$  initiates the peroxidation of AA producing biologically active by-products affecting hepatic lipid metabolism. The **objectives** were to evaluate the role of  $H_2O_2$  in the generation of these by-products and understand how these molecules influence liver lipid metabolism by looking at the activity of three important enzymes that regulate it. **Methods:** mass spectrometry (MS) documented the contribution of  $H_2O_2$  and light-excited riboflavin (Rf) in the formation of ascorbic acid's by-products. Sixteen 3-day old guinea pig pups received an intravenous solution (5% dextrose, 0.45% NaCl, 1U/ml heparin) for 4 days supplemented with control or test mixtures. Control mixtures: photo-protected AA + Rf (without  $H_2O_2$  by-products). Test mixture: photo-exposed AA + Rf (with  $H_2O_2$  by-products). After 4 days, hepatic acetyl coenzymeA-carboxylase (ACC), AMP-activated protein kinase (AMPK), triacylglycerol hydrolase (TGH) and the redox were measured. We also looked at the triglycerides (TG) levels in the plasma and liver and analyzed the fourth-day urine by mass spectrometry. **Results:** The formation of molecules 136 and 208 is dependent of the presence of  $H_2O_2$ , whose formation is itself dependent of light and time. Animals receiving light-exposed solutions expressed higher ACC activity while AMPK and TGH were more affected by high AA concentrations. Animals receiving the highest AA concentration had lower TG levels and higher redox. **Conclusion:** This study demonstrates that  $H_2O_2$  induces the transformation of ascorbic acid into biologically active compounds that potentially affect liver lipid metabolism and redox status. We suggest that these molecules have peroxide and aldehyde functions.

**Key words:** Parenteral nutrition, vitamin C peroxidative degradation, photo-excited riboflavin, lipid metabolism, mass spectrometry.

## TABLE DES MATIÈRES

PAGE DE PRÉSENTATION	i
IDENTIFICATION DU JURY	ii
ABRÉGÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
REMERCIEMENTS	xi

## 1.INTRODUCTION

### 1.LA NUTRITION PARENTÉRALE ET SES COMPLICATIONS

1.1 LA NUTRITION PARENTÉRALE	3
1.2 LES COMPLICATIONS HÉPATIQUES	3
1.2.1 LA CHOLESTASE	4
1.2.2 LA STÉATOSE	4
1.3 LES CAUSES DE LA STÉATOSE	4

### 2. UNE CHARGE OXYDANTE IMPORTANTE

2.1 L'ORIGINE DE CES PEROXYDES	6
2.2 LE STRESS OXYDATIF ET LES DÉFENSES DU PRÉMATURÉ	10
2.2.1 LES PROPRIÉTÉS DU H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10
2.2.2 LA RÉACTION DE FENTON	11
2.3 LE STATUT ANTIOXYDANT DU PRÉMATURÉ	12
2.3.1 LES ANTI-OXYDANTS ENZYMATIQUES	12
2.3.2 LES ANTI-OXYDANTS NON ENZYMATIQUES	13

### 3. LA VITAMINE C

3.1 STRUCTURE ET FONCTIONS	14
3.2 UNE VITAMINE À DOUBLE TRANCHANT	16
3.2.1 MÉCANISME ANTI-OXYDANT	16
3.2.2 MÉCANISME PRO-OXYDANT	16

3.3.3 UNE FONCTION CONTROVERSÉE	17
3.3LA DÉGRADATION DE LA VITAMINE C	18
3.3.1 STABILITÉ	18
3.3.2 LE DHA, LE DKG ET LES AUTRES	18
4.MÉTABOLISME DES LIPIDES	
4.1 UN PRODUIT DE DÉGRADATION DE LA VITAMINE C AFFECTE LE MÉTABOLISME DES LIPIDES	20
4.2 LE MÉTABOLISME DES LIPIDES	21
4.2.1 L'ACÉTYL-CoA CARBOXYLASE (ACC)	21
4.2.2 PROTÉINE KINASE DÉPENDANTE DE L'AMP (AMPK)	22
4.2.3 LA TRIACYLGLYCÉROL HYDROLASE (TGH)	23
2.HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	
2.1HYPOTHÈSES	26
2.2 OBJECTIFS	26
2.2.1 OBJECTF PRINCIPAL	26
2.2.2 OBJECTIFS SECONDAIRES	26
2.2.3 STATISTIQUES	27
3.MANUSCRIT CLINICAL CHEMISTRY	28
4.MATÉRIEL ET MÉTHODES	67
5.RÉSULTATS	75
6.DISCUSSION	79
7.LISTE DES RÉFÉRENCES	87



**LISTE DES FIGURES**

- Figure 1 :** La voie classique de la dégradation de la vitamine C (p.56).
- Figure 2 :** Spectre de masse d'un mélange, exposé à la lumière, d'acide ascorbique en présence de riboflavine (p.57).
- Figure 3 :** Effet de la lumière sur la génération de produits de dégradation de la vitamine C (p.58)
- Figure 4 :** Effet du sodium métabisulfite sur la génération des produits de dégradation de la vitamine C (p.59).
- Figure 5 :** Effet du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la génération des produits de dégradation de la vitamine C (p.60).
- Figure 6 :** Spectre de fragmentation de l'ion m/z135 issu de dégradation à la lumière de la vitamine C et de l'acide thréonique commerciale (p.61).
- Figure 7 :** Effet des molécules 136 et 208 sur l'activité de l'ACC (p.62).
- Figure 8 :** Abondance des ions m/z 135, 191 et 207 dans l'urine de cochons d'Inde qui reçoivent des mélanges d'acide ascorbique et de riboflavine (p.63).
- Figure 9 :** Activation de l'ACC en fonction des concentrations urinaires des produits de dégradation de la vitamine C (p.64).
- Figure 10 :** Voie proposée de l'oxydation de l'acide déshydroascorbique (DHA) en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p.65).
- Figure 11 :** Fragmentation chimique proposée de l'acide thréonique et de la molécule 136 (p.66).
- Figure 12 :** Régulation du métabolisme des lipides hépatiques (p.24).
- Figure 13 :** Activité de l'AMPK, activée ou non par le 5'AMP, chez des cochons d'Inde qui reçoivent le mélange vitamine C et riboflavine, protégé ou non de la lumière (p.78).
- Figure 14 :** Activité de la TGH chez des cochons d'Inde qui reçoivent le mélange vitamine C et riboflavine, protégé ou non de la lumière (p.78).

**Figure 15** : Niveaux des triglycérides hépatiques et plasmatiques chez des cochons d'Inde qui reçoivent le mélange vitamine C et riboflavine, protégé ou non de la lumière (p.79).

**Figure 16** : Redox hépatique des cochons d'Inde qui reçoivent le mélange vitamine C et riboflavine, protégé ou non de la lumière (p.79).

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

AA	: Acide ascorbique
ACC	: Acétyl CoA carboxylase
AFR	: Ascorbate free radical
5'-AMP	: Adénosine monophosphate
AMPK	: protéine kinase activée par l'AMP
ATP	: Adénosine triphosphate
CTP1	: Carnitine palmitoyl-CoA acyltransférase 1
DHA	: Acide déshydroascorbique
DKG	: Acide 2,3-dicétogulonique
Fe <sup>+2</sup>	: Fer ferreux
Fe <sup>+3</sup>	: Fer ferrique
GSH	: Glutathion sous sa forme réduite
GSSG	: Glutathion sous sa forme oxydée, glutathion dissulfure
HMG-CoA	: 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A
HNE	: 4-hydroxynonéanal
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Peroxyde d'hydrogène
hν	: Lumière
I/G	: Ratio insuline/glucagon
LDL	: Low density lipoprotéines
MPA	: Acide méta-phosphorique
MV	: Multi-vitamines
NP	: Nutrition parentérale
OH <sup>•</sup>	: Radical hydroxyle
PEG	: Polyéthylène glycol
PP2A	: Phosphatase 2A
Rf	: Riboflavine ou vitamine B <sub>2</sub>
ROS	: Espèces radicalaires dérivées de l'oxygène ( <i>reactive oxygen species</i> )
TG	: Triglycérides
TGH	: Triacylglycérol hydrolase

THDH : Tétrahydroxydicétohexanoate

T-BARS : Substances réactives à l'acide thiobarbiturique

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche pour ses nombreux encouragements, ses précieux conseils et la confiance qu'il a eu en moi pour ce retour aux études.

Un grand merci au centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine et à tout le personnel de la direction.

J'aimerais remercier Thérèse Rouleau pour m'avoir appris toutes les techniques de laboratoire, et de s'être occupée des animaux ainsi que Blandine Comte pour m'avoir enseigné la spectrométrie de masse.

**1-INTRODUCTION**

Le taux de survie des prématurés a beaucoup augmenté ces dernières années. Ceci est principalement attribuable aux progrès de la médecine. Depuis 20 ans, il est passé de 0 à 50% pour les bébés nés à la 23<sup>ième</sup> semaine de grossesse<sup>1</sup>.

En parallèle, des complications pulmonaires telle que la bronchodysplasie ou oculaires comme la rétinopathie, liées à cette prématurité, sont de plus en plus fréquentes<sup>2</sup>.

Il a été proposé qu'une cause majeure de ces complications soit liée aux défenses anti-oxydantes immatures<sup>3</sup> du prématuré et à la présence de peroxydes dans les solutions de nutrition parentérale (NP). Ces peroxydes proviennent principalement de l'exposition des multi-vitamines (MV), une composante de la NP, à la lumière ambiante<sup>4</sup>. L'infusion de MV exposées à la lumière à des animaux nouveaux-nés est associée à un remodelage pulmonaire similaire à la bronchodysplasie<sup>5</sup> observée chez les nouveau-nés prématurés et au développement d'une stéatose hépatique, une complication bien documentée de la NP. Cette dernière complication est l'objet de mon mémoire.

Bien que le  $H_2O_2$  soit la forme dominante des peroxydes formés dans les MV exposées à la lumière, il ne semble pas être directement lié à la stéatose<sup>6</sup>. Nous avons soupçonné un produit issu de la photo-dégradation de la vitamine C, induite par le  $H_2O_2$ , comme étant hépato-toxique.

L'hypothèse principale :

L'un des métabolites issu de la photo-dégradation de la vitamine C serait en partie responsable du dérèglement du métabolisme lipidique observé chez l'animal sous nutrition parentérale.

Nous avons donc 2 objectifs :

- Évaluer le rôle du  $H_2O_2$  dans la génération de ces molécules, et proposer un mécanisme réactionnel.
- Déterminer si ces métabolites influencent l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides.

Les résultats sont en partie décrits dans un manuscrit soumis à la revue Clinical Chemistry. Puisque ce manuscrit n'est inséré au mémoire qu'à la page 28, la numérotation des figures ne suit pas leur ordre d'apparition dans le mémoire.

## **1-La nutrition parentérale et ses complications**

### **1.1-La nutrition parentérale**

La nutrition parentérale est essentielle pour le prématuré qui n'est pas en mesure de s'alimenter par voie orale <sup>7</sup>. Elle fait partie intégrante des soins prodigués dès la naissance et est administrée par un cathéter directement dans la veine centrale. Les volumes et les besoins nutritionnels varient avec la maturité de l'enfant. Pour assurer sa survie et son développement, elle doit constituer un bon apport d'acides aminés, de glucose, de lipides, de minéraux, ainsi que des vitamines, telles que les vitamines C et E. Ces vitamines agissant comme de puissants anti-oxydants, aident à renforcer les défenses anti-oxydantes du nouveau-né face à la surcharge oxydante laquelle survient dès la naissance, entre autre sous forme d'une oxygénation favorisant la formation de radicaux libres <sup>8</sup>. Mais ces solutions contiennent également des molécules, comme la riboflavine (Rf) et la vitamine C, qui favorisent *in vitro*, la formation de peroxydes. Le mélange de toutes ces molécules dans un même environnement est un endroit propice à de nombreuses réactions chimiques, particulièrement la dégradation de la vitamine C.

### **1.2-Les complications hépatiques**

On connaît depuis longtemps le lien qui existe entre la nutrition parentérale et certaines maladies du foie. Des complications hépatiques apparaissent chez environ 30% <sup>9</sup> des enfants sous perfusion, après seulement 2 semaines. Chez le prématuré qui reçoit une NP, les transaminases hépatiques telles que l'alanine transaminase, l'aspartate transaminase ainsi que des enzymes comme la glutamyl



transpeptidase, ou l'alkaline phosphatase <sup>10</sup> sont élevées dans le plasma, ce qui est indicatif d'un désordre fonctionnel du foie.

Il y a deux complications hépatiques majeures associées à la nutrition parentérale : La cholestase <sup>11</sup> et la stéatose <sup>12</sup>.

### **1.2.1-La cholestase**

Elle se définit comme la diminution et parfois même l'arrêt total de l'écoulement du liquide biliaire, dont les constituants peuvent parfois refluer dans le sang. La cholestase qui se développe chez l'enfant qui reçoit une NP est généralement réversible sauf chez le prématuré qui est plus à risque d'en garder des séquelles <sup>13</sup>.

### **1.2.2-La stéatose**

La stéatose, ou foie gras, se caractérise par une accumulation de corps gras, essentiellement des triglycérides. Au niveau pathologique, on observe un élargissement du foie, accompagné d'une pâleur et d'une coloration jaunâtre. Le diagnostic reste cependant difficile car rarement symptomatique. C'est probablement la raison pour laquelle elle est peu documentée chez le nouveau-né. Par ponction hépatique et biopsie, on observe des vacuoles de stéatose de tailles et de formes variées qui peuvent être micro vacuolaires (plus petites que les noyaux) ou macro vacuolaires (occupent presque toute la cellule). Par tests sanguins, on mesure des niveaux de triglycérides plasmatiques élevés <sup>14</sup>.

Dans le cadre de mon projet de maîtrise, je me suis principalement intéressé aux effets de la nutrition parentérale sur le développement de la stéatose hépatique.

### **1.3-Les causes proposées de la stéatose**

Plusieurs études ont tenté de déterminer les causes du dysfonctionnement hépatique associé à la nutrition parentérale et les hypothèses sont nombreuses :

- On a rapidement éliminé l'absence de nutrition par voie orale <sup>15</sup>, c'est-à-dire le manque de stimulation du système entérique, comme responsable du développement de la stéatose.
- On a soupçonné des produits toxiques issus de la photo-décomposition <sup>16</sup> de certains acides aminés en présence de riboflavine <sup>17</sup> tels que le tryptophane, la méthionine, la tyrosine ou la cystéine.
- On a soupçonné une déficience en choline car les niveaux plasmatiques de choline <sup>18</sup> sont très faibles chez des patients qui reçoivent une NP prolongée. Une déficience en choline semble interférer avec la sécrétion des TG par le foie <sup>19</sup>.
- Du glucagon, ajouté à la NP <sup>20</sup>, diminue l'incidence de la stéatose. L'insuline, contrairement au glucagon, a pour effet d'augmenter la biosynthèse des lipides et de favoriser la sécrétion des acides gras. Une NP trop riche en glucose, donc hyper calorique, entraîne une augmentation du ratio insuline/glucagon (I/G) <sup>21</sup> et favorise le développement de la stéatose.
- Les lipides <sup>22</sup> présents dans la NP semblent prévenir le développement de la stéatose. On observe que le rat qui reçoit une NP supplémentée de lipides ne développe pas de stéatose, probablement à cause de la diminution du ratio I/G. Ce n'est pas le cas du rat qui reçoit une NP sans lipides. Il semble également que le type de lipide <sup>23</sup> utilisé est important; les triglycérides à chaînes courtes sont moins efficaces que les triglycérides à longues chaînes pour prévenir la stéatose.  
Depuis quelques années, la composition de la NP a considérablement changée. La réduction de l'apport calorique et l'ajout de lipides a grandement contribué à diminuer l'incidence de ces complications.
- La lumière est un élément très important car lorsque l'on protège la NP de la lumière <sup>24</sup>, on minimise le dysfonctionnement hépatique.

- La stéatose a également été associée à un dysfonctionnement de la mitochondrie : soit au niveau de la  $\beta$  oxydation, du transport des acides gras par la route carnitine-dépendante ou de la production défectueuse d'ATP. La mutation du gène de l'adénosine kinase <sup>25</sup> conduit à l'accumulation de triglycérides hépatiques chez la souris et au développement d'une stéatose sévère. La transition entre l'utilisation du glucose, la source majeure d'énergie chez le fœtus, à l'utilisation des acides gras chez le nouveau-né indique à quel point la mitochondrie est importante pour le métabolisme énergétique.

Nous avons démontré chez le cochon d'inde, que la perfusion de solutions de MV exposées à lumière entraînaient le développement d'une stéatose et que cette complication n'était pas due à un effet direct du  $H_2O_2$  <sup>6</sup>. Nous émettons l'hypothèse que le  $H_2O_2$  est associé à la génération d'un xénobiotique biologiquement actif qui serait directement ou indirectement lié au dysfonctionnement du métabolisme des lipides hépatiques.

L'hypothèse du dysfonctionnement hépatique associé à la NP chez le prématuré implique à la fois un stress oxydant causé par des quantités importantes de radicaux libres présentes dans la NP ainsi que des mécanismes de défenses anti-oxydant déficients ou inefficaces.

## **2-Une charge oxydante importante**

### **2.1-L'origine de ces peroxydes**

Plusieurs laboratoires ont démontré que la nutrition parentérale représentait une charge oxydante considérable pour le prématuré, surtout lorsque exposée à la lumière.

Dans des mélanges lipides, vitamines (1%) et acides aminés, on peut mesurer entre 200 et 400uM de peroxydes<sup>26</sup> formés. Ce sont les solutions de MV exposées à la lumière<sup>4</sup> qui contribuent le plus à la formation des peroxydes dans les TPN, bien plus que la photo-oxydation des lipides. Il y a une forte corrélation positive entre la concentration en MV dans la NP et les quantités de peroxydes formées. On peut d'ailleurs prévenir leur formation en y ajoutant du sodium métabisulfite<sup>27</sup>, un anti-peroxyde. Il est important de noter que les prématurés reçoivent des concentrations de MV beaucoup plus élevées (2-5%) que les adultes (0.1%)<sup>28</sup> et conséquemment plus de peroxydes. On considère que les nouveaux-nés perfusés avec une NP supplémentée avec 1% de MV reçoivent en moyenne 400-500  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  /jour/litre.

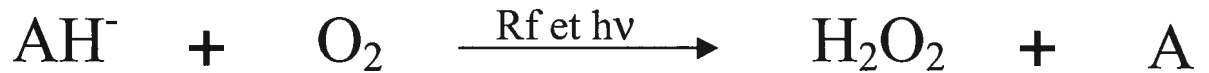
On retrouve des concentrations urinaires de peroxydes plus élevées chez le prématuré qui reçoit de la NP<sup>29</sup> non protégée de la lumière. Cela suggère que les vitamines anti-oxydantes comme les vitamines C et E, présentes dans ces solutions, ne sont pas totalement en mesure de prévenir leur formation. Peut-être parce que ces vitamines ont davantage des propriétés anti-radicalaires que anti-peroxydes.

La lumière est un facteur important dans la formation des peroxydes dans les solutions de MV.

Il y a 2 molécules qui sont particulièrement susceptibles à la lumière : la riboflavine et les polysorbates. Ces derniers, des détergents qui favorisent la solubilisation des vitamines liposolubles et hydrosolubles dans un même milieu, ne semblent pas contribuer<sup>30</sup> à la formation des peroxydes. La riboflavine, quant à elle, est une vitamine impliquée dans plusieurs réactions métaboliques, incluant la chaîne respiratoire. Elle semble plutôt agir comme catalyseur, car même absente, on observe l'apparition de peroxydes dont 80% sont du  $\text{H}_2\text{O}_2$ , car éliminés en présence de catalase.

La génération de peroxydes en présence de vitamine C et de riboflavine est déjà bien connue.

Voici un schéma simplifié de cette réaction :



L'anion ascorbate et l'oxygène, en présence de riboflavine(Rf) et de lumière(hv), génère la formation de peroxydes d'hydrogène.

Cette équation suggère que l'on puisse limiter la formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en contrôlant la luminosité et l'oxygène dissout.

La riboflavine (Rf), qui fait partie de la famille des vitamines B<sub>2</sub>, favorise la dégradation <sup>31</sup> de la vitamine C en présence de lumière. On la retrouve sous forme libre ou comme flavine (FAD ou FMN) et les deux formes sont présentes dans les solutions de MV.

L'ion ascorbate réagit directement avec la riboflavine excitée, en présence d'oxygène, pour former « l'ascorbate free radical » (AFR) <sup>32</sup>, un intermédiaire dans sa décomposition en déshydroascorbate (DHA).

La Rf excitée par la lumière a un potentiel réducteur de 1.89V et peut oxyder un grand nombre de molécules <sup>33</sup> comme la doxorubin ou l'acide ascorbique. Cette oxydation causée par la photo-excitation de la Rf peut être de 2 types <sup>34</sup> :

Type I : la Rf, dans un état excité, peut soutirer un électron (ou un atome d'hydrogène) d'un substrat oxydable et générer un radical.

Type II : La Rf peut également transférer son énergie à l'oxygène moléculaire dissout pour devenir un <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Cet oxygène singulet peut alors voler une paire d'électrons à une molécule organique.

La Rf peut induire la photo-modification de composés, qui comme la vitamine C, n'absorbent pas ou ne sont pas directement modifiés par la lumière. Il est important de comprendre la photo-modification des bio-molécules car ils peuvent

se produire dans des systèmes qui sont exposés à la lumière comme les sacs de NP, les milieux de culture cellulaire, la nourriture, et certains organes comme la peau et les yeux.

Pourrait-on infuser la Rf séparément des mélanges de MV afin de prévenir la dégradation de la vitamine C et la formation de peroxydes? Nous avons démontré dans des études préliminaires non publiées que l'infusion de Rf exposée à la lumière ambiante générerait un stress oxydant chez l'animal.

La lumière est donc un élément important qui favorise la formation de peroxydes<sup>35</sup> dans les sacs de NP. Un moyen efficace pour prévenir ou ralentir leur apparition serait de recouvrir les sacs contenant des MV et d'utiliser une tubulure ambrée<sup>36</sup>. Cela paraît être une solution relativement simple, mais difficilement applicable dans des conditions cliniques pour les raisons suivantes :

- Les NP sont exposées à la lumière lors de leur préparation par le pharmacien.
- L'absence de tubulure ambrée.
- Le temps de transit de la solution dans la tubulure est plus long chez le prématuré.
- Les enfants qui doivent subir une photo-thérapie pour la jaunisse sont exposés, de manière prolongée, à une forte intensité lumineuse.

L'oxygène dissout joue également un rôle essentiel dans la formation des peroxydes dans la NP<sup>28</sup> mais c'est un élément plus difficile à contrôler, surtout lors de la manipulation et de la préparation des solutés.

## 2.2-Le stress oxydatif et les défenses du prématuré

### 2.2.1-Les propriétés du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Les espèces radicalaires dérivées de l'oxygène (ROS) <sup>37</sup> ont surtout été considérés comme des sous-produits toxiques du métabolisme, mais à de faibles niveaux, sont impliqués dans de nombreux processus biologiques importants tels que la signalisation, la prolifération et la différenciation cellulaire. C'est à des niveaux plus élevés que leurs activités sont potentiellement toxiques.

Les dommages que peut causer le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les systèmes biologiques sont bien connus :

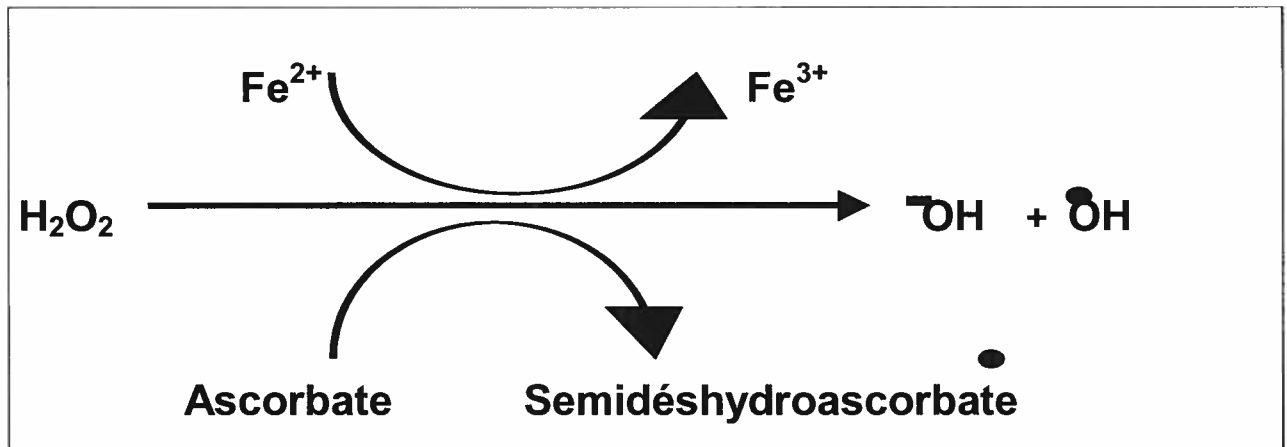
Dans les poumons <sup>38</sup> de faibles doses de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (75uM) entraînent une diminution de la production de surfactant ainsi qu'une augmentation de la perméabilité des capillaires <sup>39</sup> tandis que dans le cœur <sup>40</sup> il peut endommager les cellules musculaires lisses, qui sont particulièrement susceptibles à l'attaque oxydante. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut induire l'apoptose <sup>41</sup> de cellules en culture, inhiber la production d'ATP des hépatocytes <sup>42</sup>, et causer des dommages à l'ADN génomique <sup>43</sup>. Dans l'organisme, La détoxification ou l'élimination du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se fait par l'intermédiaire d'enzymes comme la catalase ou la glutathion peroxydase.

Toutes les cellules ont une concentration basale de radicaux libres, mais leurs formations et leurs éliminations sont rigoureusement contrôlées afin de protéger les cellules de leurs dommages. Un radical libre est une entité chimique très réactive avec un électron solitaire qui recherche un partenaire pour sa stabilité.

Le peroxyde d'hydrogène, en lui même, n'est pas très réactif <sup>44</sup> mais il peut facilement s'accumuler et diffuser entre et à l'intérieur des cellules. Par contre, il peut causer des dommages par la réaction de Haber-Weiss, catalysée par des métaux comme le fer (réaction de Fenton), en formant le radical hydroxyle, qui lui est très réactif et dommageable <sup>45</sup>.

## 2.2.2-La réaction de Fenton

C'est en 1894 que H.J.H. Fenton découvre que certains métaux transitoires, comme le fer ferreux ou le cuivre, en présence de peroxyde d'hydrogène, entraînent la génération du radical hydroxyle, un radical libre très réactif <sup>46</sup>. Ces métaux, qui possèdent un électron solitaire, aux pouvoirs catalytiques puissants, sont impliqués dans de nombreuses réactions physiologiques importantes comme l'apoptose <sup>47</sup>. La réaction de Fenton est la décomposition du  $H_2O_2$ , en présence de fer ferreux. Cette réaction est favorisée par l'ascorbate.



On parle de stress oxydatif lorsque les niveaux de radicaux libres de l'oxygène et autres molécules oxydantes dépassent les capacités anti-oxydantes du système. Dans un organisme sain, il doit exister un équilibre entre la production de radicaux libres et les réactions anti-oxydantes qui les contrôlent, ces molécules pouvant causer des dommages irréversibles à la cellule. Par exemple, la peroxydation des lipides peut entraîner une désorganisation des structures membranaires et un dysfonctionnement des protéines qui y sont imbriquées.

Dans les solutions de MV exposées à la lumière, on mesure des concentrations élevées de  $H_2O_2$  et autres peroxydes organiques. Le prématuré est-il capable de se défendre contre cette charge oxydante massive?



## **2.3-Le statut antioxydant du prématuré**

Le prématuré subit effectivement un stress oxydatif. On le mesure par des niveaux plus élevés, chez le prématuré, de F2-isoprostane dans le plasma <sup>48</sup> ou de 8-oxo-guanine <sup>49</sup> dans l'urine, tous deux des marqueurs de stress oxydatif. On observe également des concentrations de peroxydes urinaires plus élevées <sup>29</sup> chez les nouveau-nés qui reçoivent une NP exposée à la lumière. Cela suggère un système de défense anti-oxydant immature et inefficace pour éliminer <sup>50</sup> complètement les peroxydes infusés.

Il y a chez le prématuré un déséquilibre entre les concentrations de peroxydes reçues et les défenses anti-oxydantes.

Les moyens de défenses de l'organisme contre les oxydants sont multiples. On peut les classer en 2 groupes : il y a les défenses enzymatiques avec la superoxyde dismutase, la catalase, ou la glutathion peroxidase et les mécanismes non-enzymatiques comme avec les vitamines A, C et E ainsi que le glutathion.

Plusieurs études ont démontré l'immaturité de ces système de défense chez le prématuré :

### **2.3.1-Les antioxydants enzymatiques**

Comparée aux bébés nés à terme, l'activité d'enzymes comme la catalase ou la glutathion peroxidase, dans le sang de cordon, est plus faible chez les prématurés <sup>51, 52, 53</sup>. L'exposition de lapins prématurés à un environnement riche en oxygène n'entraîne pas d'augmentation dans l'activité de ces enzymes, à l'inverse du lapin <sup>54</sup> né à terme, qui semble réagir plus au stress oxydatif.

### 2.3.2-Les antioxydants non-enzymatiques

Cette immaturité serait également associée à des réserves en vitamines antioxydantes plus faibles. À la naissance, les niveaux de vitamine E, une vitamine dont le transfert à travers le placenta est limité, augmentent significativement chez le nouveau-né, mais chez le prématuré, les niveaux à la naissance<sup>55</sup> sont beaucoup plus faibles et n'augmentent<sup>56</sup> pas autant. C'est également le cas pour la vitamine A. Pour la vitamine C<sup>57</sup>, les niveaux sont beaucoup plus élevés dans le sang de cordon que dans le sang maternel et les niveaux sont également plus faibles chez le prématuré. C'est le DHA, la forme oxydée de la vitamine C, qui traverse plus facilement le placenta, avant d'être reconverti en vitamine C. Ce recyclage de DHA en vitamine C se fait, entre autre, par l'intermédiaire du système glutathion.

Le GSH représente l'une des premières lignes de défenses contre le stress oxydant. Dans le sang, 99% du glutathion sont présents dans les globules rouges et maintiennent l'hémoglobine dans sa forme réduite. C'est un tri-peptide qui agit comme co-facteur de l'enzyme glutathion-peroxidase. Chez des animaux qui reçoivent une NP, on observe une diminution des niveaux de GSH et une augmentation du stress oxydant mesuré par les niveaux de T-BARS. Par ailleurs, il a été observé que l'accouchement augmente les réserves en molécules antioxydantes dans les globules rouges, comme le glutathion<sup>58</sup> des enfants nés à terme, pas chez le prématuré. Nous avons démontré des niveaux de glutathion plus faibles dans les leucocytes d'enfants nés prématurément<sup>59</sup>.

Il y a 2 enzymes importantes impliquées dans le métabolisme du glutathion : la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase, qui a pour fonction de lier un résidu de cystéine à l'acide glutamique, et la glutathion synthétase qui ajoute un résidu de glycine à la cystéine. Les niveaux de glutathion plus faibles ne semblent pas être dus à une immaturité du système enzymatique<sup>60</sup>. Par contre, cela pourrait être lié au transport actif de la cystéine, un des 3 acides aminés essentiels dans la formation du glutathion avec la glycine et le glutamate. Ce transport est déficient chez les prématurés, plus particulièrement chez les garçons, et corrèle avec le degré de

prématurité <sup>61</sup>. L'ajout de cystéine <sup>62</sup>, absent des solutions de MV, n'a aucun effet sur les niveaux de GSH hépatique.

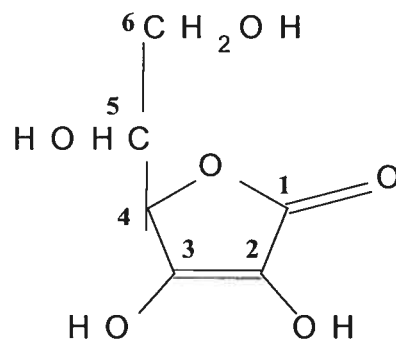
L'infusion seule de peroxydes chez le cochon d'inde, entraîne une diminution des niveaux de GSH hépatique <sup>63</sup> ce qui n'est pas le cas de l'animal qui reçoit des solutions de MV riches en peroxydes. Cela pourrait s'expliquer par l'existence d'une interaction entre le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et les MV. L'ajout de glutamine <sup>64</sup> semble normaliser les niveaux de GSH mais n'a aucun effet sur les niveaux des T-BARS, donc sur le stress oxydant.

Le système anti-oxydant du glutathion réduit en H<sub>2</sub>O le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> généré dans les solutions de nutrition parentérale. Le GSH, un bon réducteur, donne un électron, par l'entremise de la glutathion peroxidase, et ainsi devient radicalaire. Il réagit par la suite avec une autre molécule de glutathion radicalaire pour donner le GSSG, non radicalaire. Dans cette étude, nous avons mesuré les niveaux de GSH et de GSSG hépatique après perfusion de vitamine C exposée à la lumière, afin de déterminer le statut redox du foie.

Nous venons de voir que le prématuré n'est pas bien armé pour se défendre contre les peroxydes reçus avec la NP et que l'une des molécules responsables de leur formation est la vitamine C.

### 3-La vitamine C

#### 3.1-Structure et fonctions biologiques



Acide ascorbique

La vitamine C est essentielle pour l'être humain. À l'origine, en raison de ses propriétés anti-scorbutiques mais aujourd'hui on lui attribue de nombreuses autres vertus et fonctions biologiques. L'incapacité pour certains mammifères tels que l'homme ou le cochon d'inde de la synthétiser est causée par l'absence de l'enzyme L-gulono-lactone oxidase, la dernière impliquée dans sa biosynthèse.

La question que l'on peut se poser, c'est pourquoi avoir perdu cette capacité alors que nos besoins en vitamines C sont si importants?

La vitamine C est un cétolactone de 6 carbones que l'on retrouve partout dans le corps humain comme dans les glandes surrénales, le foie, le thymus <sup>65</sup> et les neurones.

La vitamine C et le DHA, la forme oxydée de la vitamine C, sont transportés dans la cellule par des mécanismes distincts. C'est un transporteur de glucose <sup>66</sup>, le GLUT-I, qui est impliqué dans le transfert du DHA dans le cytosol, ou il est réduit en AA par réaction enzymatique (la DHA réductase) et non-enzymatique (GSH).

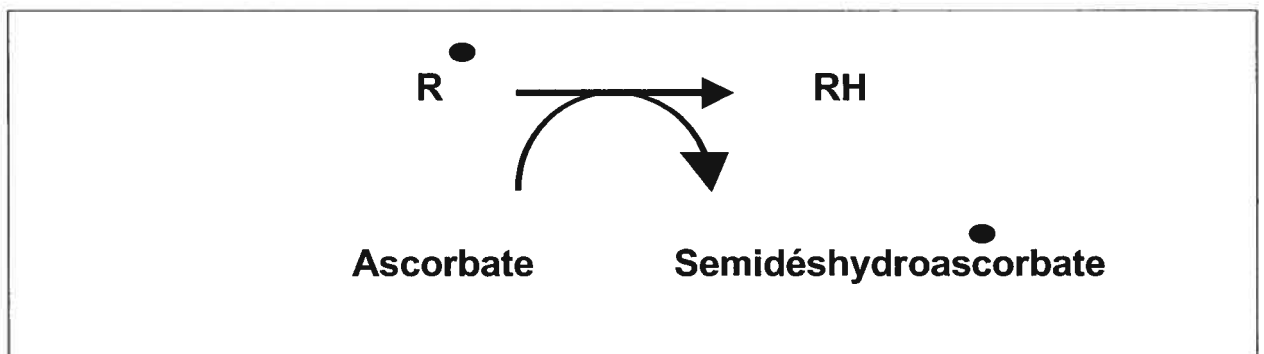
Les multiples fonctions et activités biologiques de la vitamine C ont été décrites dans un très grand nombre d'articles de revue. Elle est impliquée dans la biosynthèse du pro-collagène, de la carnitine, de certains neurotransmetteurs et dans la formation du cholestérol et des catécholamines <sup>67</sup>. Elle agit comme co-facteur dans des réactions d'hydroxylation et d'amidation par le transfert d'électrons. Sa fonction principale dans les systèmes biologiques, est sa participation en tant que co-substrat dans des réactions catalysées par des 2-oxoacid-dépendente-dioxygénase (2-ODD). Ces enzymes catalysent l'incorporation de l'oxygène dans plusieurs substrats organiques. En général, ces enzymes requièrent la présence de  $Fe^{2+}$ , de 2-oxoglutarate et de vitamine C.

### 3.2- Une vitamine à double tranchant

#### 3.2.1- Mécanisme antioxydant de la vitamine C

Un anti-oxydant est une entité chimique capable de prévenir ou d'inhiber l'oxydation d'une molécule susceptible. Les avis concernant la vitamine C sont partagés : des études démontrent clairement que la vitamine C est un excellent anti-oxydant tandis que d'autres le mettent en doute.

La vitamine C est un anti-oxydant intra et extracellulaire important des systèmes biologiques. Sa fonction majeure réside dans son activité anti-radicalaire : l'anion ascorbate, un agent réducteur, inactive les radicaux libres en leur donnant un électron.



#### 3.2.2- Mécanisme pro-oxydant de la vitamine C

Dans certaines conditions, la vitamine C peut effectivement avoir une activité pro-oxydante qui est le résultat de la combinaison de métaux, d'ascorbate et de radicaux libres <sup>68</sup>.

On associe cette activité pro-oxydante au fait que la vitamine C, en présence de métaux de transition comme le fer ou le cuivre <sup>69</sup> et de peroxyde d'hydrogène, dans un système communément appelé le Udenfriend <sup>70</sup>, génère le radical hydroxyle, qui est lui-même très oxydant. C'est la réaction de Haber-Weiss.

L'acide ascorbique, en réduisant le fer qui à son tour réduit le  $H_2O_2$  en radical hydroxyle, favorise la réaction de Fenton.

Les exemples dans la littérature sont nombreux :

La vitamine C peut induire l'apoptose <sup>71</sup> de cellules cancéreuses en culture. Cette activité, qui n'est observée qu'à des concentrations relativement élevées de vitamine C, est causée par le peroxyde d'hydrogène car elle peut facilement être inhibée par l'ajout de catalase. Deutsch propose que l'activité pro-oxydante <sup>72</sup> de la vitamine C se fait par l'intermédiaire du radical AFR (ascorbate free radical) qui est la molécule intermédiaire de la dégradation de l'acide ascorbique en déshydroascorbate (DHA).

### 3.3.3-Une fonction controversée

L'existence de la réaction de Fenton *in vivo* est controversée, principalement en raison de la disponibilité de fer libre dans les systèmes biologiques. Pour éviter la formation de radicaux libres dans l'organisme, le fer est associé à des protéines comme la transferrine ou la lactoferrine. Des études ont démontré que même en présence de fer, la vitamine C conservait son activité anti-radicalaire.

L'acide ascorbique protège les lipides plasmatiques <sup>73,74</sup> de la peroxydation, en présence de fer et de  $H_2O_2$ . Elle protège les poumons <sup>75</sup> des dommages oxydants induit chimiquement par le paraquat, seulement si elle est infusée très tôt. Une fois les dommages cellulaires trop avancés, elle agit plutôt comme pro-oxydant à cause du fer libéré par les cellules endommagées. Il n'y a pas d'augmentation du stress oxydant, mesuré par les niveaux de T-BAR, dans des tranches de foie <sup>76</sup> auxquelles on ajoute du fer, mais seulement avec des homogénats.

Certains proposent que chez le prématuré, l'association fer-transferrin ne soit pas suffisamment forte <sup>77</sup> pour prévenir la réduction du fer par l'ascorbate.

On observe chez des souris qui reçoivent une diète riche en fer <sup>78</sup> une augmentation du stress oxydant mais que celui-ci n'est pas exacerbé par la présence de vitamine C.

Certains affirment que la vitamine C n'a pas véritablement d'activité pro-oxydante et que celle observée n'est due qu'à une mauvaise méthodologie expérimentale et aux marqueurs de peroxydation utilisés <sup>69</sup>. Je pense que l'acide ascorbique possède effectivement une activité pro-oxydante *in vitro* comme nous l'avons déjà démontré par la formation de radicaux libres dans des NP supplémentées de fer libre <sup>79</sup> mais que *in vivo* celle-ci est limitée.

Dans le cadre de la NP et de la stéatose qui lui est associée, se sont les propriétés *in vitro* de la vitamine C qui font l'objet de ce mémoire.

### **3.3-La dégradation de la vitamine C**

#### **3.3.1-Stabilité de l'acide ascorbique dans les NP**

La dégradation de l'acide ascorbique (AA) dans les sacs de NP est exacerbée par plusieurs facteurs : un pH élevé, la lumière, la température, la perméabilité des sacs de NP à l'oxygène <sup>80</sup>, la présence de métaux transitoires, l'absence de certains acides aminés (cystéine) <sup>81</sup>, ou l'absence de bisulfite.

*In vitro*, environ 50% de l'acide ascorbique disparaît après 1h, à 24°C à la lumière, après 3h lorsque protégé de la lumière, et en 9h à 4°C sans lumière <sup>82</sup>.

Les solutions de NP doivent contenir tous les éléments essentiels à la thérapie nutritionnelle, incluant les vitamines instables. On peut se poser la question de l'entreposage à long terme des sacs de MV et conséquemment les concentrations réelles infusées aux nouveaux-nés.

### 3.3.2-Le DHA, le DKG et les autres

La dégradation de l'AA est un processus très complexe ce qui pourrait en partie expliquer son importance biologique. Sa dégradation est une série de décarboxylations successives<sup>83</sup> jusqu'au thréonate, une molécule très stable dans un environnement oxydant. Ces réactions sont importantes car certaines propriétés attribuées à l'AA pourraient en fait provenir de l'un de ses dérivés.

La vitamine C est un agent réducteur à la fois *in vivo* et *in vitro*. La première étape de son oxydation, est sa conversion en DHA par la perte de 2 atomes d'hydrogène. Le DHA est la forme oxydée réversible de l'acide ascorbique. L'activité biologique majeure attribuée à la vitamine C semble se faire autour de cette réaction d'inter-conversion, impliquée dans de nombreuses réactions enzymatiques. On considère l'AA comme la forme active, même si le DHA semble plus efficace que la vitamine C pour protéger les LDL de l'oxydation en présence de métaux de transition<sup>84</sup>. Ce qui distingue le DHA de l'AA, est sa plus grande réactivité et instabilité en solution et le fait qu'il peut être à la fois oxydé ou réduit.

La présence de métaux comme le cuivre ou le fer<sup>85</sup> ne semble pas influencer sa dégradation comme c'est le cas avec la vitamine C. Étant potentiellement dommageable pour les cellules, car il peut réagir avec des résidus de lysinyl ou d'arginyl présents dans les protéines, les tissus maintiennent des niveaux de DHA relativement faibles. D'ailleurs, une fois transporté dans la cellule, il est rapidement réduit en AA.

*In vitro*, cette réaction d'inter-conversion<sup>86</sup> est favorisée à un pH acide (entre 4-6) et à température physiologique. La conversion en DHA<sup>87</sup> se fait par l'intermédiaire d'un radical libre, le semi-déshydroascorbate (AFR) qui est relativement stable. Ce dernier peut être reconverti en AA par l'enzyme AFR réductase.

Le DHA très instable à pH et à température physiologique, se dégrade rapidement en acide 2,3-dicétogulonique (DKG) par l'ouverture du cycle lactone entre les carbones 1 et 4 (voir figure p.14). La formation du DKG à partir du DHA est spontanée à pH acide.



Simpson <sup>88</sup> suggère l'existence de 2 voies dans la dégradation de l'acide ascorbique à pH physiologique. La voie empruntée serait déterminée par le statut redox du milieu. Une voie oxydative et une voie non oxydative : en présence d'oxygène, le DKG produira du thréonate, du CO<sub>2</sub> et de l'oxalate, tandis qu'en son absence, il se formera principalement de l'érythrulose (ERU) et de l'oxalate.

Deutsch propose que la dégradation de l'AA, en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et à pH élevé, <sup>89</sup> entraîne la formation de 2 molécules: un composé de 4 carbones, l'acide thréonique et le tétrahydroxydicétohexanoate (THDH).

## **4-Le métabolisme des lipides**

### **4.1-Un produit issu de la photo-dégradation de la vitamine C affecte le métabolisme des lipides**

Dans ce mémoire, nous proposons qu'en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'AA se dégrade en 2 molécules de mêmes poids moléculaires mais différentes que celles proposées par Deutsch, c'est-à-dire l'acide thréonique et le THDH <sup>90</sup> et que ces molécules influencent le métabolisme des lipides.

Nous avons observé par des études de spectrométrie de masse <sup>90</sup> que l'acide ascorbique, en présence de riboflavine et de lumière, est rapidement éliminée. On observe parallèlement la génération de produits de dégradation correspondant à des masses sur charge (m/z) 135, 207, et 191. Ces ions, également présents dans des solutions de MVP 1% exposées à la lumière, sont les plus abondants. Des études par Deutsch ont proposé que l'ion m/z135 (acide thréonique) dérivait de l'ion m/z191 (DKG) mais nos analyses par spectrométrie de masse en tandem (ms/ms) montrent plutôt qu'il serait l'ion fille du m/z207. Dans ce mélange, il y a également formation de peroxydes, dont une partie seulement peut être éliminée par la catalase, ce qui suggère la présence de peroxydes organiques.

L'un des objectifs de ce mémoire est de comprendre la réaction conduisant à la formation de ces métabolites.

## 4.2-Le métabolisme des lipides

On soupçonne qu'une molécule issue de la photo-dégradation de la vitamine C à la lumière agirait sur le métabolisme des lipides.

De nombreux articles ont déjà démontré l'effet que peut avoir la nutrition parentérale sur le métabolisme des lipides, sur les enzymes qui y sont impliquées, et le développement de la stéatose hépatique dans un modèle animal.

Le cochon d'inde, qui reçoit une NP riche en glucose, développe rapidement une hyper-triglycéridémie <sup>91</sup> accompagnée d'une réduction significative de l'activité de la lipoprotéine lipase <sup>92</sup>, une enzyme impliquée dans l'absorption des triglycérides en circulation. Chez le rat, on observe que l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase est augmentée tandis que les activités de certaines enzymes microsomiales hépatiques (fatty acid ligase ou phosphatidic acid phosphatase) impliquées dans la synthèse de lipides complexes, demeurent inchangés. La sécrétion des TG est également inhibée <sup>93</sup>. Tous ces facteurs font qu'il y a accumulation de TG dans le foie.

C'est par l'étude de 3 enzymes (l'ACC, l'AMPK et la TGH) impliquées dans la régulation du métabolisme des lipides (*figure12, page 24*), que nous avons voulu comprendre comment notre mélange de vitamine C et de riboflavine exposé à la lumière entraînait une augmentation des niveaux de TG, que se soit par l'augmentation de la synthèse ou la diminution de la sécrétion.

### 4.2.1-L'acétyl-CoA carboxylase (ACC)

L'ACC est une enzyme régulatrice de la lipogénèse. Elle catalyse la formation du malonyl-CoA <sup>94</sup>, un substrat essentiel de la synthèse des acides gras.

Il y a deux iso-formes de cette enzyme, ACC1 et ACC2, issus de gènes distincts, mais toutes deux exprimées dans le foie.

Elles possèdent des expressions tissulaires et des propriétés enzymatiques différentes : le malonyl-CoA, produit par l'ACC1, est principalement utilisé pour la

synthèse des acides gras tandis que le malonyl-CoA produit par l'ACC2 est plutôt impliqué dans la bêta oxydation <sup>95</sup> des acides gras. Ce dernier inhibe allostériquement la carnitine palmitoyl-CoA acyltransférase 1 (CTP1), une enzyme qui favorise le transfert des acides gras à longues chaînes du cytosol à la mitochondrie, ce qui a pour conséquence de ralentir leur oxydation <sup>96</sup>. L'ACC2 et la CTP1 co-localisent dans la mitochondrie.

Régulation de l'activité de l'ACC :

Il y a 2 mécanismes : par modulation allostérique ou par contrôle enzymatique (phosphorylation/déphosphorylation) :

Allostériquement : le citrate, un précurseur de l'acétyl-CoA, et le glutamate <sup>97</sup>, un acide aminé intracellulaire abondant, activent l'ACC. La coenzyme A quant à elle inhibe son activité. Enzymatiquement, l'AMPK en phosphorylant le résidu de sérine à la position 79, inhibe l'ACC.

Lorsque l'AMPK est activée, par exemple lors d'un stress cellulaire ou lors d'un exercice physique soutenu, la bêta oxydation des acides gras est activée par la phosphorylation de l'ACC-2 tandis que leur synthèse est inactivée par la phosphorylation de l'ACC-1.

La déphosphorylation de l'ACC se fait par l'intermédiaire d'une phosphatase sérine/thréonine de type 2A (PP2A) <sup>4,98,99</sup> dont l'activité est stimulée par des cations comme le  $Mn^{2+}$  ou le  $Mg^{2+}$ .

#### **4.2.2-Protéine kinase dépendante de l'AMP (AMPK) :**

On sait que l'ACC est modulée par l'AMPK et la PP2A.

L'AMPK est une enzyme hépatique importante qui agit comme un détecteur du niveau énergétique cellulaire. Lorsque les niveaux d'ATP <sup>100</sup> sont bas, l'AMPK activée met la cellule en mode génération d'ATP et économie d'énergie. La cellule peut diminuer la consommation d'ATP en ralentissant la synthèse des acides gras <sup>101</sup> et des stérols, qui consomme beaucoup d'énergie, et mettre en marche des réactions qui favorisent la synthèse d'ATP comme la glycolyse et la  $\beta$ -oxydation.

Ce système répond surtout au ratio ATP/AMP plutôt qu'aux niveaux d'AMP seulement.

L'AMPK, une kinase, a au moins 2 cibles : l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et la HMG-CoA réductase (3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase).

L'HMG-CoA réductase, qui est impliquée dans la synthèse du cholestérol, et l'ACC sont toutes deux inactivées lorsque phosphorylées par l'AMPK.

L'activité de l'AMPK est hautement régulée : soit par phosphorylation par la kinase AMPKK ou par le 5'AMP <sup>102</sup>.

Les modes d'activations par le 5'AMP sont multiples:

- Activation allostérique de l'AMPK et de l'AMPKK
- Le 5'AMP peut se lier directement à l'AMPK et favoriser sa phosphorylation par l'AMPKK au résidu de thréonine à la position 172 ainsi que bloquer sa déphosphorylation par une phosphatase.

Tous ces mécanismes font que l'AMPK est extrêmement sensible à de faibles variations des niveaux d'AMP cellulaire. Un dysfonctionnement de cette enzyme cause des désordres physiologiques qui ressemblent à ce que l'on observe chez des patients atteints de diabète de type II <sup>103</sup>.

Il est très difficile de mesurer l'activité des phosphatases. Pour étudier la PP2A, nous avons utilisé une méthode indirecte en mesurant l'activité de l'ACC en présence ou non de glutamate. Le glutamate active l'ACC en favorisant l'activité de la PP2A <sup>98</sup>.

#### **4.2.3-La triacylglycéról hydrolase (TGH) :**

Finalement, nous avons voulu étudier la sécrétion des triglycérides en mesurant l'activité de la TGH.

Le foie sécrète des triacylglycéról (TAG) dans des particules VLDL. Le rôle de la TGH <sup>104</sup> est d'hydrolyser les TAG intracellulaires hépatiques avant qu'ils ne soient intégrés dans les VLDL et sécrétés par le foie. La combinaison de la réduction de la lipolyse par la TGH accompagnée d'une augmentation de leur biosynthèse

pourrait en partie expliquer l'accumulation de triglycérides hépatiques, observé chez l'animal qui reçoit de la NP.

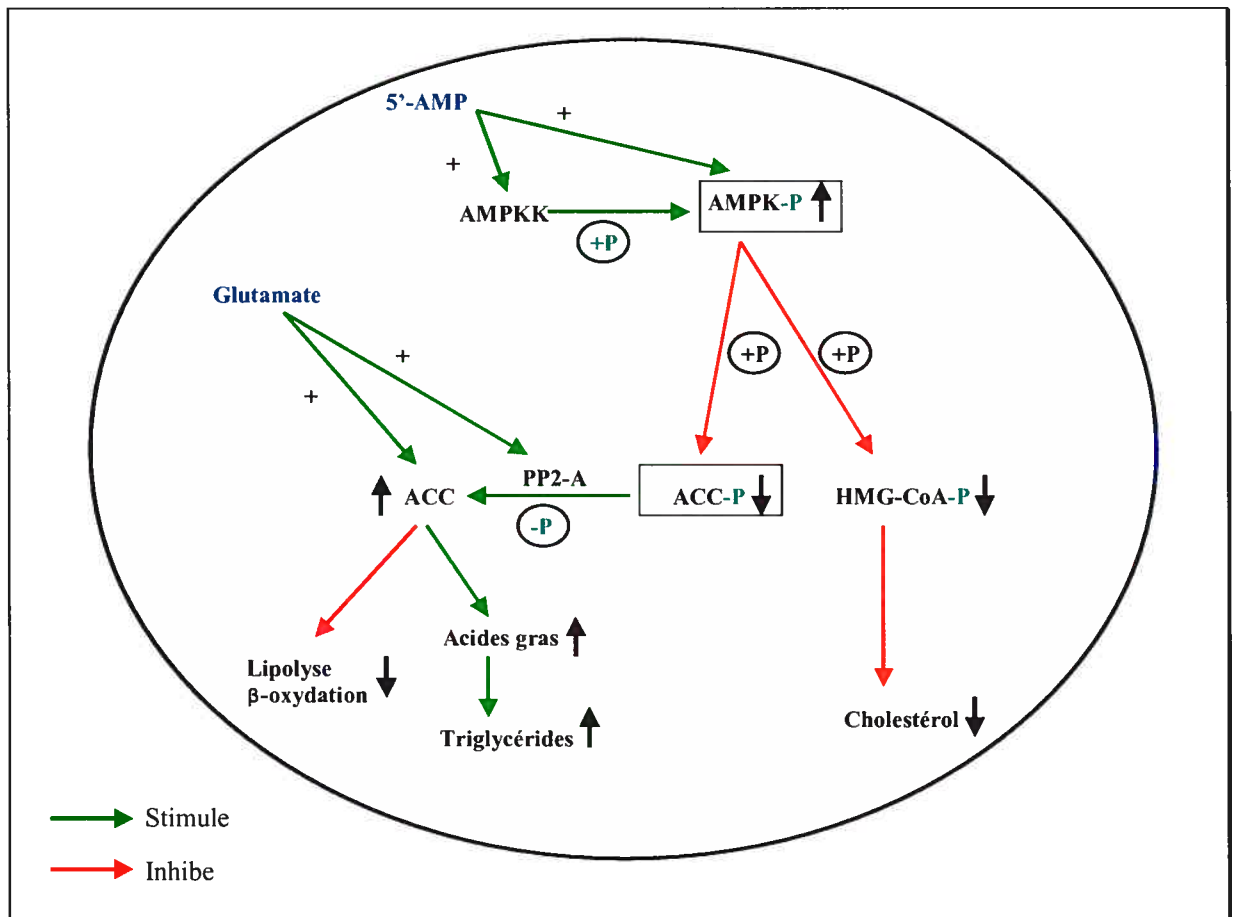


Figure 12 : régulation du métabolisme des lipides hépatiques

## **2-HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS**

## **2.1-Hypothèse**

Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> présent dans les solutions de MV exposées à la lumière initie la peroxydation de la vitamine C et entraîne la génération de sous produits hépatotoxiques qui peuvent affecter le métabolisme des lipides hépatiques.

## **2.2- Objectifs**

### **2.2.1-Objectif principal**

Comprendre, par la spectrométrie de masse, les mécanismes réactionnels dans la formation des métabolites issus de la dégradation de la vitamine C en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Quatre protocoles ont été dessinés pour l'atteinte de cet objectif, et se retrouvent dans le manuscrit soumis à la revue Clinical Chemistry, en mars dernier, à partir de la page 28 de ce mémoire.

### **2.2.2-Objectifs secondaires**

Comprendre comment ces métabolites influencent le métabolisme lipidique en étudiant l'activité de 3 enzymes régulatrices et corrélérer les niveaux urinaires de ces métabolites avec les activités enzymatiques et les concentrations de triglycérides. Les protocoles et résultats de certains de ces objectifs se retrouvent également dans le manuscrit.

En plus de ce qui est décrit dans le manuscrit, les activités de l'AMPK et de la TGH ainsi que le statut redox ont également été mesurés dans le foie de ces animaux. Les niveaux de TG ont été mesurés dans le foie et dans le plasma. Les méthodes, les protocoles ainsi que les résultats se retrouvent à la page 67 de ce manuscrit.

### **2.2.3-Statistiques**

Toutes les données sont exprimées comme moyenne  $\pm$ s.e.m et comparées par la méthode factorielle ANOVA, après vérification de leur homoscedasticité par le Chi carré de Bartlett. Le degré de signification est établi à  $p < 0.05$ .



**3-MANUSCRIT  
CLINICAL CHEMISTRY**

De: Clinical Chemistry Editorial Office [clinchemed@clinchem.aacc.org]

Envoyé: 12 mai 2005 16:23

À: Jean-Claude Lavoie

Cc: Laurent Knafo; Philippe Chessex; Thérèse Rouleau

Objet: Clinical Chemistry -- Manuscript Decision

RE: Clinical Chemistry MS ID# CLINCHEM/2005/050427

TITLE: Association between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent by-products of ascorbic acid and increased hepatic acetylcoenzymeA carboxylase activity

Dear Dr. Lavoie:

Thank you for your revised (and interesting) manuscript. It is scientifically acceptable and will be processed for publication. With the current workload, we anticipate that you will receive proofs within 4-6 weeks.

If page proofs are returned promptly, your paper is scheduled to appear in the August issue. Papers in press are posted online 2-6 weeks before the issue date. Issues are scheduled to be mailed to subscribers and appear on the Internet before the first day of the issue month. The electronic version (<http://www.clinchem.org>) is published at Stanford University's HighWire Press, where your article will be linked electronically to and from PubMed and directly to and from over 340 other journals that are on-line at Stanford.

Thank you for this contribution.

Sincerely,

Dr. David Bruns

Editor

Drug Monitoring and Toxicology

**Association between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent by-products of ascorbic acid and increased hepatic acetylcoenzymeA carboxylase activity.**

**Laurent Knafo\*, Philippe Chessex\*\*, Thérèse Rouleau\*, Jean-Claude Lavoie\***

\*Research Centre and Paediatric Department, CHU Sainte-Justine, University of Montreal, Montreal, Qc, Canada, \*\*Division of Neonatology, Children's and Women's Health Centre of British Columbia, Vancouver, BC, Canada.

Address for mailing correspondence and reprint requests:

Jean-Claude Lavoie

Research Centre

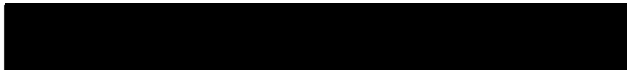
CHU Sainte-Justine

3175 Chemin Côte Ste-Catherine,

Montreal, Qc, Canada, H3T 1C5

Telephone: (514) 345-4931 #3940

FAX: (514) 345-4801



Running title: **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent ascorbate byproducts raise ACC activity.**

## Abstract

**Background:** Parenteral multivitamin preparation (MVP) induces a fatty liver in neonatal guinea pig pups. This is prevented by photo-protection. Photo-excited riboflavin present in MVP generates  $H_2O_2$  and molecules with masses of 136 and 208. We hypothesize that  $H_2O_2$  initiates the peroxidation of ascorbic acid producing biologically active by-products affecting hepatic lipid metabolism.

**Methods:** Mass spectrometry (MS) documented the participation of  $H_2O_2$  and light-excited riboflavin (Ribo) in the formation of by-products of ascorbic acid (AA). Sixteen 3-day old guinea pig pups received an intravenous solution (5% dextrose + 0.45% NaCl + 1 U/ml heparin) at 240 ml/kg/d for 4 days enriched with control or test mixtures. Control mixture: photo-protected AA+Ribo (without by-products or  $H_2O_2$ ). Test mixture: AA+Ribo treated to generate by-products of AA without  $H_2O_2$ . Hepatic acetyl coenzymeA-carboxylase (ACC) activity was determined after 4 days. Fourth-day urine samples were analyzed by MS. Data were treated by ANOVA, alpha setting at 0.05.

**Results:**  $H_2O_2$  did not influence the classical degradation of AA, as the generation of 2,3-diketogulonic acid was not affected. In contrast, the formation of molecules-136 and -208 was  $H_2O_2$  and time dependent. ACC activity was higher ( $p < 0.01$ ) in animals receiving high concentration of molecules-136 & -208, its hepatic activation correlated ( $p < 0.01$ ) with the urinary levels of molecule-208.

**Conclusion:** The present study demonstrates that  $H_2O_2$  at concentrations found in the clinical setting of total parenteral nutrition induces the transformation of dehydroascorbic acid into compounds which have the potential to affect lipid metabolism. We suggest that these molecules have peroxide and aldehyde functions.

### List of abbreviations

AA	Ascorbic acid
ACC	Acetyl CoenzymeA Carboxylase
DHA	Dehydroascorbate
DKG	2,3-diketogulonic acid
MS	Mass spectrometer
MVP	Parenteral multivitamin preparation
TPN	Total parenteral nutrition

### Introduction

Subjects with an impaired ability to be fed by mouth for long periods of time require intravenous nutrient support or total parenteral nutrition (TPN). However, hepatic complications such as steatosis are common with this life saving mode of parenteral nutrition (1). The aetiology of the TPN-related steatosis is multifactorial (2) and many nutritional elements have been suspected such as an amino acids imbalance (3-6), an excess of glucose or lipids (7), or a carbohydrate to nitrogen imbalance (8). Oxidative stress (1, 9-11) and products derived from photo-oxidation of amino acids (9, 12) have also been proposed. In a previous study (13), we reported that in a neonatal animal model on TPN, fatty liver was associated with the infusion of parenteral multivitamin preparations (MVP), a component of TPN. We suspected an ingredient of MVP that might be generated during light-exposure. A mass spectroscopy study (14) led us to document the light-dependent formation of by-products of ascorbic acid, the most abundant of which had molecular masses of 136 and 208 (named hereafter “molecule-136” and “molecule-208”).

The antioxidant property of ascorbic acid (AA) resides in its ability to lose two electrons, generating dehydroascorbate (DHA) in a reversible reaction. The subsequent oxidation of DHA causes opening of the lactam ring leading to 2,3-diketogulonic acid (DKG) (**15-18**). The degradation of DKG produces threonic acid (**19**), which has also a molecular mass of 136 (**Figure 1**). As molecule-136 found in light-exposed MVP solutions derives from the by-product molecule-208 and not from DKG (**14**), we suspected that it would be different from threonic acid. Based on previous reports (**14, 20**) it was hypothesised that the difference in reactions leading to the generation of molecule-136 and threonic acid resides in the presence of  $H_2O_2$ . In light-exposed MVP, photo-excited riboflavin catalyses transfer of electrons from a donor such as ascorbic acid to oxygen, thereby generating hydrogen peroxide (**21**).

Because our previous study suggested that  $H_2O_2$  was an important factor in the formation of molecules-136 & -208, we hypothesized that in presence of  $H_2O_2$ , a peroxidative pathway of ascorbic acid leading to formation of molecules-136 & -208 competes with its classical degradation to DKG. Therefore, the first objective of the present study was to assess the role of  $H_2O_2$  in the generation of these molecules. The second aim was to discriminate molecules-136 from threonic acid. The next aim was to propose a chemical structure for molecule-136 and-208. The last aim was to test their biochemical activity by measuring their effect on hepatic lipid metabolism.

## **Material and Methods**

To fulfill the objectives of this study, *in vitro* as well as *in vivo* studies were designed.

### *In vitro*

The concentrations of L-ascorbic acid (AA) (1.8 mM) and riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>) (30 μM) used in the study are equivalent to those reported by the manufacturer for 2% (v,v) multivitamin preparation (Multi-12 pediatric, Sabex Boucherville, Qc, Canada). This concentration as well as the exposure to ambient light (75 foot candles) corresponds to clinical conditions found in neonatal TPN solutions. The cocktail of AA and riboflavin (Ribo), in water, generates approximately  $660 \pm 28$  μM (mean  $\pm$  s.e.m., n=5) of peroxides (according to the FOX method (**22-24**)) when exposed 24 hours to ambient light. The mass spectrum of this solution is shown in **Figure 2**.

Predominant by-products formed following oxidation or light-degradation of AA (**14**, **15**, **18**) are DHA, DKG, molecule-136 and molecule-208. Therefore monitoring was limited to AA, DKG and molecules-136 and -208. Because mass spectrometer (MS) was operated in negative mode, DHA was not detectable. DKG served to monitor the classical oxidation of AA. Molecule-136 and its parent particle, molecule-208 (**14**), served to monitor the peroxidation of AA. In the negative mode, AA, DKG, molecules-136 and -208 have an *m/z* of 175, 191, 135 and 207, respectively.

Protocol 1. The effect of photo- exposed riboflavin on the generation of by products of ascorbate was tested by measuring the relative abundance of ions  $m/z = 175, 191, 135$  and  $207$  from solutions, prepared in water, that contain  $1.8 \text{ mM}$  AA (Sigma, St-Louis, MI, USA) in the presence or absence of  $30 \text{ }\mu\text{M}$  riboflavin (Sigma), exposed or not to ambient light, and incubated at room temperature ( $22^\circ\text{C}$ ) for up to 24 hours.

Protocol 2. The effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on the generation of by-products of ascorbate was tested by measuring the relative abundance of ions  $m/z = 175, 191, 135$  and  $207$  in the following solutions exposed to ambient light, prepared in water and incubated for up to 24 hours at room temperature:

- a)  $1.8 \text{ mM}$  AA +  $30 \text{ }\mu\text{M}$  riboflavin in presence or not of  $0.4 \text{ mM}$  Na bisulfite (a peroxide scavenger (**20, 22**)). Bisulfite was added first to quench the peroxides formed.
- b)  $1.8 \text{ mM}$  AA with increasing concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , up to  $0.8 \text{ mM}$ , in presence or not of  $30 \text{ }\mu\text{M}$  riboflavin.

Protocol 3. The speculation that molecules-136 and -208 have a peroxide function was tested by measuring the relative abundance of ions  $m/z = 135$  and  $207$  in solutions containing  $1.8 \text{ mM}$  AA +  $30 \text{ }\mu\text{M}$  riboflavin treated or not 15 minutes with  $0.4 \text{ mM}$  Na bisulfite, added after the 24 hour-exposure to ambient light.

Protocol 4. To test whether molecule-136 is different from threonic acid, fragmentation spectra of commercial threonic acid (Aldrich, St-Louis, MI, USA) and molecule-136 were compared. Molecule 136 was derived from a solution



containing 1.8 mM AA + 30  $\mu$ M riboflavin and exposed to ambient light 24 hours at room temperature,.

### *In vivo*

As described previously (13, 25, 26) three-day old Hartley guinea pig pups (Charles River, St-Constant, Qc, Canada) were fed exclusively, via a jugular fixed catheter, with an intravenous solution (5% (w/v) dextrose + 0.45% (w/v) NaCl + 1 U/mL heparin) at a continuous rate of 24 mL/d/100 g body weight. After 4 days, the animals were anaesthetized and their liver was minced and frozen at -80°C until acetyl coenzymeA carboxylase (ACC) (EC 6.4.1.2) activity determination. ACC is a known key enzyme involved in hepatic triglyceride synthesis and accumulation. Animals were housed in an institutional vivarium with a 12:12h dark:light cycle. The protocols were carried out in accordance with the Canadian Council of Animal Care guidelines.

Protocol 5. The effect of molecules-136 and 208 on hepatic ACC activity was assessed in 16 animals. Four groups of 4 animals receiving for 4 days two concentrations of test or control solutions were compared. These 2 concentrations correspond to the amounts of AA and riboflavin reported by the manufacturer for 1 and 5% MVP. These are concentrations at the extremes of what is used in TPN solutions prepared for premature newborn. To confirm that the animals received test or control solutions, the abundance of ions  $m/z = 191, 135$  and  $207$  was measured by MS in the 4<sup>th</sup> day urine. These ions were also measured in a fifth group receiving the base solution devoid of vitamins. Results were normalized for creatinine as followed: abundances in fixed 20  $\mu$ L /  $\mu$ g creatinine.

*Test solution:*

1%) 1.8 mM AA + 30  $\mu$ M riboflavin + 800  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 15 mL water, or

5%) 9.0 mM AA + 150  $\mu$ M riboflavin + 800  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 15 mL water.

These solutions were 1) exposed to ambient light for 24h (75 foot candles) to generate molecules 136 & 208, 2) treated with catalase (100 U/mL for 15 minutes) to eliminate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3) filtered centrifuge (4000g, 15 minutes) with a Centricon plus-20 (Millipore, 10,000 Nominal Molecular Weight limit) to eliminate the enzyme catalase and sterilize the solutions, and 4) diluted 1:1 with basal solution (10% (w/v) dextrose + 0.90% (w/v) NaCl + 2 U/mL heparin).

*Control solution:*

Same as the test solution except that 1) AA and riboflavin were added in water containing 1 mM Na bisulfite, 2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was not added and 3) the solutions remained photo-protected for 24 h before catalase treatment.

## MASS SPECTROMETRY

Sample preparations:

- *In vitro* solutions: 5  $\mu$ L were injected without preparation
- Urine: Samples were acidified 1:1 with perchloric acid and centrifuged 20 min – 4000g - 4°C. 20  $\mu$ L of supernatant were injected on a C<sub>18</sub> column (Zorbax Eclipse XDB C<sub>18</sub>, 4.6 mm x 25 cm) with a gradient from 40% acetonitrile (60% water) to 60 % in 15 min. The retention time was 5.17  $\pm$  0.05 minutes, the ions were not separated.

Samples were injected into an Agilent (St-Laurent, Qc, Canada) simple quadrupole LC/MS 1100 mass spectrometer. Electrospray was the mode of ionization used and the MS was operated in negative mode. The ions were monitored using either the SIM mode for the selected ions or the SCAN mode in the mass over charge range of 50 to 250 m/z. Conditions were: fragmentor 70V, capillary voltage 3000V, nitrogen flow 13L/min, nebulizer pressure 50 psi and gas temperature 300°C. The direct injections were done with a constant flow of H<sub>2</sub>O/acetonitrile (70/30%) at a rate of 0.4mL/min. Tandem mass spectrometry was performed on an Agilent ion-trap mass analyzer to compare the fragmentation spectra of threonic acid to molecule-136 produced from the mixtures of AA and riboflavin exposed to ambient light for 24 hours. The samples were introduced by infusion with the same mode of ionization and detection used above.

#### ACETYL-COA CARBOXYLASE ACTIVITY

Acetyl coenzymeA carboxylase (ACC) activity was measured in liver extracts as described by Kudo *et al* (27). The 6% PEG 8000 fraction in buffer (60.6 mM TRIS acetate, 1 mg /ml BSA, 1.3 µM 2-mercaptoethanol, 5 mM Mg acetate, 2.1 mM ATP, 1.1 mM acetylCoA, pH 7.5) was pre-incubated 20 minutes at 37°C in presence or not of 1.1 mM glutamate. This amino acid stimulates ACC activity by favouring the action of protein phosphatase A2 (28, 29). The ACC activity was determined using the (3 x 10<sup>6</sup> dpm) <sup>14</sup>C-bicarbonate fixation assay (total volume: 165 µl) (28). After 5 minutes incubation, 10% perchloric acid was added to stop the reaction. The supernatant of a 20 min x 1000g centrifugation was transferred into vials, dried overnight and counted using a β-counter. The ACC activity was

expressed as nmol malonyl CoA produced / min / mg protein. Protein was determined using the Bradford colorant from Bio-Rad Laboratories.

## STATISTICAL ANALYSIS

Data, expressed as mean  $\pm$  s.e.m., were compared by factorial ANOVA after verification of their homoscedasticity by Bartlett's Chi squared. The threshold of significance was set at  $p < 0.05$ .

## Results

### *In vitro*

**Figure 2** represents a scan between  $m/z$  50 and 250 that confirms the presence of the 3 targeted species in this study, namely  $m/z = 135$  (molecule-136), 191 (DKG) and 207 (molecule-208). Ion  $m/z = 175$  (ascorbic acid) does not appear because it was completely degraded upon prolonged light exposure (**14**).

The rapid degradation of ascorbic acid and the generation of the molecules-136 & -208 were a function of time ( $p < 0.01$ ), presence of riboflavin ( $p < 0.01$ ) and light exposure ( $p < 0.01$ ) (**Figure 3**). In all situations, the relative abundance of molecule-136 was higher than molecule-208. Concomitantly, without riboflavin or light, the generation of ion  $m/z = 191$  (DKG) was dependant on time ( $p < 0.01$ ). In the presence of riboflavin+light, the formation of DKG was accelerated but reached a plateau after 3 hours.

The addition of bisulfite (**Figure 4**) during the initial step of mixing the components contributed to reduce ( $p < 0.01$ ) the loss of AA and the generation of molecules 136

& 208. The generation of DKG was not affected by the presence of bisulfite. However, when added at the end of the 24h incubation, bisulfite lowered ( $p < 0.01$ ) the relative abundances of ions  $m/z = 135$  and  $207$  by 65% and not the intensity of  $m/z 191$  (data not shown).

The influence of hydrogen peroxide on the degradation kinetic of AA is shown in **figure 5**. The disappearance of AA in the reaction mixture as well as the production of molecules-136 & -208 was proportional to the peroxide concentrations ( $p < 0.01$ ), time ( $p < 0.01$ ), and the presence of photo-excited riboflavin ( $p < 0.01$ ). The effect of peroxides did not appear at 24 h incubation in presence of riboflavin as modifications in ions  $m/z = 135$ ,  $175$  and  $207$  abundances reached a plateau. The effect of peroxides on the formation of DKG differed. Without riboflavin, in the first 3 hours, the amount of DKG in the milieu was independent of peroxide concentrations, whereas after 24 hours DKG levels decreased as a function of increasing peroxide levels. This negative effect of peroxides was also observed in the presence of riboflavin. Without peroxide, the presence of photo-exposed riboflavin enhanced DKG production, which was proportionally lower in the presence of peroxides. The negative effect of peroxides on the abundance of DKG may suggest degradation or lower generation of the molecule. The concomitant increasing abundance of molecules-136 and -208 proposes a competitive utilization of the substrate leading to a lower DKG production.

To discriminate molecule-136 from threonic acid, commercial threonic acid was compared to ion  $m/z = 135$  present in the test mixture (1.8 mM AA + 30  $\mu$ M

riboflavin +light at room temperature for 24 hours) by tandem mass spectrometry. The ion  $m/z = 135$  from each solution was trapped and fragmented. The fragmentation spectra are shown in **Figure 6**. The most abundant ions  $m/z = 75$ , 89, 117, 135 were common to both solutions but the particle  $m/z = 133$  was specific to the AA + riboflavin mixture.

### *In vivo*

The initial body weight differed ( $p < 0.01$ ) between groups receiving control or test solutions ( $112 \pm 2$  vs.  $98 \pm 3$  g, respectively), but not between doses (1 vs. 5%) ( $107 \pm 3$  vs.  $104 \pm 5$  g, respectively). The statistical analysis of hepatic ACC activities showed a significant interaction ( $p < 0.05$ ) between parameters, leading us to analyze data according to the presence of glutamate (**Figure 7**). There was a significant effect ( $p < 0.01$ ) of dose only in animals receiving test solutions and only on activated ACC (in presence of glutamate). Abundances of  $m/z = 135$  and 207, but not of 191, were higher ( $p < 0.01$ ) in urine of animals receiving test solutions (**Figure 8**). The 3 ions were higher ( $p < 0.05$ ) in the 5% solution. Abundances of ions in urine from animals receiving 1 % control solution were not different than those from animals receiving the base solution devoid of vitamin.

The phosphorylated form of ACC is inactive. Since glutamate is reported to facilitate the action of phosphatase on ACC (**28, 29**), we quantify its activation by measuring the ratio of activities in presence or not of glutamate. This ratio was more influenced by the concentration of vitamins used ( $p < 0.01$ ) (**Figure 9B**) than by light exposure of the solutions (control vs. test). However, the correlation between the activation of ACC and the abundance of ions  $m=z$  207 in urine

(Figure 9A) was significant ( $y = 2 \times 10^{-5}x + 1.07$ ;  $r^2 = 0.67$ ,  $p < 0.01$ ) whereas correlations with other ions were not ( $r^2 < 0.17$ ).

## Discussion

The main finding of the present study is that hydrogen peroxide at concentrations found in TPN solutions induces the transformation of dehydroascorbic acid (DHA) into new biologically active compounds. We suggest that these molecules have a peroxide and aldehyde function, and we demonstrate that they stimulate the hepatic ACC activity, a key enzyme in lipid metabolism.

Principal actors in this new pathway of degradation of DHA are photo-excited riboflavin,  $H_2O_2$  and time. All of them are present in the clinical setting of TPN, especially in neonatal care. MVP, containing ascorbic acid and riboflavin, is an essential constituent of TPN solutions. Knowing that premature newborn infants have immature antioxidant defences, physicians are prompted to prescribe antioxidant vitamins as found in MVP. Because vitamins are light-sensitive, the TPN bag is frequently covered by an opaque shield, but the tubing is rarely photo-protected (30). The lack of photo-protection of tubing coupled with the up to 4-hour transit time between the TPN bag and the site of infusion is long enough to generate peroxides (30, 31). Photo-excited riboflavin catalyzes the electron transfer between a donor, such as ascorbic acid, and dissolved oxygen to form  $H_2O_2$  (21). When 1% MVP is present in the TPN solution, peroxide concentrations measured in the tubing close to the infusion site are higher than 0.2 mM (30, 31). Peroxide generation in the TPN solution is proportional to the MVP concentration

(31). In the present study, protocols were designed to be close to clinical conditions.

**Figure 10** proposes chemical reactions leading to the production of molecules-136 & -208. Previously we reported that molecule-136 derived from molecule-208 (14). Based on its mass, the parent of molecule-208 can only be DHA. This is in accordance with Deutsch's observation (16) that the formation of ion  $m/z = 207$  derives from peroxidation of DHA. As the hydrolysis of DHA lactam ring leads to DKG production (figure 1), we propose that a double hydroxyl radical attack is required to generate the molecule-208. The intervention of hydroxyl radicals in the generation of molecule-208 has been previously demonstrated (14). Indeed, the short incubation time (30 minutes) and low peroxide levels (40  $\mu$ M) + ascorbic acid led to generation of molecules-136 and -208 only in the presence of  $Fe^{2+}$  suggesting a Fenton-like reaction. Similarly to the degradation of DKG (figure 1), decarboxylation of molecule-208 leads to the generation of ions  $m/z = 163$  and subsequently 135, both observed in mass spectrum of ascorbic acid + riboflavin solution exposed 24 hours to ambient light (figure 2).

This pathway suggests that molecule-136 (2-hydroperoxyl-3,4-dihydroxybutanal) and molecule-208 (2,3-diketo-4-hydroxyperoxyl-5,6-dihydroxyhexanoic acid) are peroxides. This is supported by the fact that the addition of bisulfite, a general peroxide scavenger (20, 22), at the end of the 24h incubation lowered by 65% their abundances. That is also in accordance with our previous study (14) in which catalase-resistant peroxides were decreased by the addition of bisulfite. However, this is in contrast with findings from Deutsch *et al* (15, 16) who suggested that the



particle  $m/z = 207$ , observed after the incubation of DHA with  $H_2O_2$ , is rather 2,3-diketo-4,5,5,6-tetrahydroxyhexanoic acid.

Although they have the same molecular mass, the small difference in chemical structure between molecule-136, generated by the  $H_2O_2$ -dependent oxidation of DHA, and threonate, derived from DKG, is confirmed by their mass fragmentation spectra (figure 6) which is explained in **Figure 11**. The mass spectra pattern presented in figures 3-5 supports the fact that molecule-136 derives from molecule-208 (14) rather than from DKG. The similarity of the  $m/z = 135$  spectra to those of  $m/z = 207$ , but not  $m/z 191$ , suggests that molecule-136 is linked to the molecule-208 and not to DKG.

The presence of reactive peroxide and aldehyde functions on molecules-136 and -208 suggests that they have potential biochemical effects. This was tested with the same animal model used to induce fatty liver in response to the infusion of MVP solution exposed to ambient light (13). The infusion for 4 days of a mixture containing high concentration of molecules 136 & 208 to neonatal guinea pig pups induced stimulation of hepatic ACC activity in presence of glutamate. As for our previous results, in which shielding TPN from light prevented the induction of fatty livers (13), the light protection of the solution (control) prevented ACC stimulation. The fact that the animals presenting the higher ACC activity had also the higher urine abundance of ions  $m/z = 135$  and 207, but not 191 (DKG), points toward the association between molecules-136 & -208 and a disturbance of hepatic lipid metabolism.

The regulation of the hepatic triglyceride pool is multifactorial. It depends on the balance between synthesis, export and mitochondrial  $\beta$ -oxidation of fatty acids. ACC is a key enzyme in the accumulation of triglycerides as it regulates the fatty acids synthesis and their mitochondrial oxidation. Indeed, malonylCoA, produced by ACC, is a substrate for fatty acid synthesis and an inhibitor of their mitochondrial  $\beta$ -oxidation. MalonylCoA inhibits carnitine palmitoyltransferase (32, 33), an enzyme catalyzing the transfer of fatty acids into the mitochondrion (32, 33). The regulation of ACC activity is dependent of its phosphorylation. The inhibitory effect of AMP-dependent protein kinase (32-34) is counteracted by protein phosphatase 2A activity (35-37). Glutamate is known to activate ACC by facilitating the action of protein phosphatase A2 (28, 29). The fact that the infusion of a mixture containing high concentration of molecules 136 & 208 stimulated the ACC activity only in presence of glutamate suggests that these molecules interfere with the phosphatase activity. The ratio of activities measured in the presence or not of glutamate would confirm this mode of action of molecules generated in test solution. But the ratio was not different according to the control or test solution. It varied in function of vitamin concentrations (Figure 9B). Because the urinary levels of molecules-136 &-208 increased also in function of vitamin concentrations received by the animals, we searched for a correlation with each ion. Only molecule-208 correlated with the activation of ACC, suggesting that this molecule may interfere with the lipid metabolism.

Further studies will be required to a) confirm the proposed structure of molecules 136 & 208, and b) document whether the biochemical activity of molecule-208 and /or -136 occurs via AMP-activated protein kinase, protein phosphatase A2 or gene

expression. However, we hypothesize that molecule-208 interferes with the phosphorylated state of ACC, leading to its activation

### **Acknowledgment**

This work was supported in part by a grant from AACCC Van Slyke Society and a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP 53270).

## References

- 1 Quigley EM, Marsh MN, Shaffer JL, Markin RS. Hepatobiliary complications of total parenteral nutrition. *Gastroenterology* 1993;104:286-301.
- 2 Dosi PC, Raut AJ, Chelliah BP, Brown EG, Karmel BZ, Krouskop RW, Sweet AY. Perinatal factors underlying neonatal cholestasis. *J Pediatr* 1985;106:471-4
- 3 Moss RL, Haynes AL, Patuszyn A, Glew RH. Methionine infusion reproduces liver injury of parenteral nutrition cholestasis. *Pediatr Res* 1999;45:664-8.
- 4 Zahavi I, Shaffer EA, Gall DG. Total parenteral nutrition-associated cholestasis: acute studies in infant and adult rabbits. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1985;4:622-7.
- 5 Shattuck KE, Grinnell C, Rassin DK. Amino acid infusions induce reversible, dose-related decreases in bile flow in the isolated rat liver. *JPEN J Parenteral Enteral Nutr* 1993;17:171-6.
- 6 Belli DC, Fournier LA, Lepage G, Yousef I, Weber AM, Tuchweber B, Roy CC. Total parenteral nutrition-associated cholestasis in rats: comparison of different amino acid mixtures. *JPEN J Parenteral Enteral Nutr* 1987;11:67-73.
- 7 Lowry SF, Brennan MF. Abnormal liver function during parenteral nutrition: relation to infusion excess. *J Surg Res* 1979;26:300-7.
- 8 Keim NL. Nutritional effects of hepatic steatosis induced by parenteral nutrition in rats. *J Parenter Enter Nutr JPEN* 1987;11:18-22.

- 9 Shattuck KE, Bhatia J, Grinnell C, Rassin DK. The effect of light exposure in the in vitro hepatic response to an amino acid-vitamin solution. *JPEN J Parenteral Enteral Nutr* 1995;19:398-402
- 10 Weinberger B, Watorek K, Strauss R, Witz G, Hiatt M, Hegyi T. Association of lipid peroxidation with hepatocellular injury in preterm infants. *Crit Care* 2002;6:521-5.
- 11 Sokol RJ, Taylor SF, Devereaux MW, Khandwala R, Sondheimer NJ, Shikes RH, Mierau G.. Hepatic oxidant injury and glutathione depletion during total parenteral nutrition in weanling rats. *Am J Physiol* 1996;270:G691-G700.
- 12 Bathia J, Mims LC, Roesel RA. The effect of phototherapy on amino acid solutions containing multivitamins. *J Pediatr* 1982;96:284-6.
- 13 Chessex P, Lavoie JC, Rouleau T, Brochu P, St-Louis P, Lévy É, Alvarez F... Photooxidation of Parenteral Multivitamins Induces Hepatic Steatosis in a Neonatal Guinea Pig Model of Intravenous Nutrition. *Pediatr Res* 2002;52:958-63.
- 14 Lavoie JC, Chessex P, Rouleau T, Migneault D and Comte B. Light-induced by-products of vitamin C in multivitamin solutions. *Clin Chem* 2004;50:135-140
- 15 Deutsch JC. Oxygen-accepting antioxidants which arise during ascorbate oxidation. *Anal Biochem* 1998;265:238-45.

16. Deutsch JC, Santhosh-Kumar CR, Hassell KL, Kolhouse JF. Variation in ascorbic acid oxidation routes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and cupric ion solution as determined by GC/MS. *Anal Chem* 1994;66: 345-50.
17. Cioffi N, Losito I, Terzano R, Zambonin CG. An electrospray ionization ion trap mass spectrometric (ESI-MS-MSn) study of dehydroascorbic acid hydrolysis at neutral pH. *Analyst* 2000;125 :2244-8.
- 18 Koshiishi I, Mamura Y, Liu J, Imanari T. Degradation of dehydroascorbate to 2,3-diketogulonate in blood circulation. *Biochim Biophys Acta* 1998;1425:209-14.
19. Deutsch JC. Spontaneous hydrolysis and dehydration of dehydroascorbic acid in aqueous solution. *Anal Biochem* 1998;260:223-9.
- 20 Brawley V, Bhatia J, Karp WB. Effect of sodium metabisulfite on hydrogen peroxide production in light-exposed pediatric parenteral amino acid solutions. *Am J Health Syst Pharm* 1998;55:1288-92
- 21 Laborie S, Lavoie JC, Chessex P. Paradoxical role of ascorbic acid and riboflavin in solutions of total parenteral nutrition: Implication in photoinduced peroxide generation. *Pediatr Res* 1998;43:601-6.
- 22 Lavoie JC, Lachance C, Chessex P. Antiperoxide activity of sodium metabisulfite. A double-edge of sword. *Biochem Pharmacol* 1994;47:871-6

- 23 Jiang ZY, Woollard ACS, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$  in the presence of Xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 1991;26:853-6.
- 24 Hermes-Lima M, Willmore WG, Story KB. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylenol orange complex formation. *Free Rad Biol Med* 1995;19:271-80
- 25 Chessex P, Lavoie JC, Laborie S, Rouleau T. Parenteral multivitamin supplementation induces both oxidant and antioxidant responses in the liver of newborn guinea pigs. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;32:316-21.
- 26 Chessex P, Lavoie JC, Laborie S, Valle J. Survival of guinea pig pups in hyperoxia is improved by enhanced nutritional substrate availability for glutathione production. *Pediatr Res* 1999;46:305-10.
- 27 Kudo N, Barr AJ, Barr RL, Desai S, Lopaschuk GD. High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* 1995 ;270: 17513-20
- 28 Boone AN, Chan A, Kulpa JE, Brownsey RW. Bimodal activation of acetyl-CoA carboxylase by glutamate. *J Biol Chem* 2000;275:10819-25
- 29 Kowluru A, Chen HQ, modrick LM, Stefanelli C. Activation of acetyl-CoA carboxylase by a glutamate-and magnesium-sensitive protein phosphatase in the Islet  $\beta$ -cell. *Diabetes* 2001;50:1580-7.

- 30 Chessex P, Laborie S, Lavoie JC, Rouleau T. Photoprotection of solutions of parenteral nutrition decreases the infused load as well as the urinary excretion of peroxides in premature infants. *Semin Perinatol* 2001;25:55-9.
- 31 Lavoie J.-C., Bélanger S., Spalinger M., Chessex P. Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition: The major contributor to in vitro generation of peroxides. *Pediatrics* 1997;99:E61-70.  
URL: <http://www.pediatrics.org/cgi/content/full/99/3/e6>.
- 32 Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D, Witters LA. Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol* 1999;276:E1-18.
- 33 Hardie DG, Pan DA. Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochem Soc Trans* 2002;30:1064-70.
- 34 Winder WW, Hardie DG. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in Type 2 diabetes. *Am J Physiol* 1999;277:E1-10.
- 35 Allred JB, Harris GJ, Goodson J. Regulation of purified rat liver acetyl CoA carboxylase by phosphorylation. *J Lipid Res* 1983;24:449-55.
- 36 Gaussin V, Skarlas P, Ching YP, Hardie DG, Hue L. Distinct type-2A protein phosphatases activate HMGCoA reductase and acetyl-CoA carboxylase in liver. *FEBS Lett.* 1997;413:115-8
- 37 Gaussin V, Hue L, Stalmans W, Bollen M. Activation of hepatic acetyl-CoA carboxylase by glutamate and Mg<sup>2+</sup> is mediated by protein phosphatase-2A . *Biochem J.* 1996;316:217-24



### Figure legends

**Figure 1. Classical pathway of oxidative degradation of ascorbic acid.**

DHA: dehydroascorbic acid; DKG: 2,3-diketogulonic acid; MW: molecular weight;  $m/z$ : mass over charge (refer to mass spectrum on figures 2-5).

**Figure 2. Mass spectrum of a light-exposed solution containing ascorbic acid and riboflavin.**

The solution contained 1.8 mM ascorbic acid and 30  $\mu$ M riboflavin. The mass spectrum was obtained after a 24h-exposure to ambient light. Upper number:  $m/z$ .

**Figure 3. Effect of riboflavin, light and time on the generation of ascorbic acid by-products.**

Mass spectra abundance of ions generated in solution containing 1.8 mM ascorbic acid (AA)  $\pm$  30  $\mu$ M riboflavin (Ribo). The rapid degradation of ascorbic acid and the generation of the molecules-136 & -208 were a function of time ( $p < 0.01$ ), presence of riboflavin ( $p < 0.01$ ) and light exposure ( $p < 0.01$ ) (+Light). Without riboflavin or light, the generation of  $m/z$  191 (DKG) was dependant on time ( $p < 0.01$ ). In the presence of riboflavin + light, the production of DKG was accelerated but reached a plateau after 3 hours. Expressed as mean of relative abundance ( $n=3$ ), S.E.M. ( $< 1\%$ ) was too small to be presented.

**Figure 4. Effect of bisulfite and time on the generation of ascorbic acid by-products.** Mass spectra abundance of ions generated in light exposed (Light) solution containing 1.8 mM ascorbic acid (AA) and 30  $\mu$ M riboflavin (Ribo). Na bisulfite, 0.4 mM, was added at the initial step. The addition of bisulfite prevented ( $p < 0.01$ ) the loss of ion  $m/z = 175$  (ascorbate) and the generation of ions  $m/z = 135$  & 207. The generation of DKG was not affected by the presence of bisulfite. Expressed as mean of relative abundance ( $n=3$ ), S.E.M. ( $< 1\%$ ) was too small to be presented.

**Figure 5. Effect of hydrogen peroxide and time on the generation of ascorbic acid by-products.** Mass spectra abundance of ions generated in light exposed solution containing 1.8 mM ascorbic acid, increasing concentrations of  $H_2O_2$  up to 0.8 mM and 30  $\mu$ M riboflavin (Ribo). The loss of ion  $m/z = 175$  (ascorbate) and the generation of ions  $m/z = 135$  & 207 were dependent of peroxide concentrations ( $p < 0.01$ ), time ( $p < 0.01$ ) and the presence of riboflavin ( $p < 0.01$ ). Without peroxide the presence of photo-exposed riboflavin enhanced ( $p < 0.01$ ) the production of ion  $m/z = 191$  (DKG), which was proportionally lower ( $p < 0.01$ ) in the presence of increasing peroxides concentrations. Expressed as mean of relative abundance ( $n=3$ ), S.E.M. ( $< 1\%$ ) was too small to be presented.

**Figure 6. Mass fragmentation spectra of ions  $m/z = 135$  from commercial threonic acid and from photo-exposed solution of ascorbic acid + riboflavin.** Panel A: Spectrum of fragmentation of commercial threonic acid. Panel B: Fragmentation spectrum of the ion  $m/z = 135$  observed in 24h photo-exposed solution containing 1.8 mM ascorbic acid + 30  $\mu$ M riboflavin. Upper number:  $m/z$ .

**Figure 7. Effect of molecules-136 & -208 on hepatic ACC activity.**

1% = 0.9 mM ascorbic acid + 15  $\mu$ M riboflavin; 5% = 4.5 mM ascorbic acid + 75  $\mu$ M riboflavin; these concentrations correspond to the amount of vitamins reported in 1 and 5% parenteral multivitamin. **Control:** photo-protected solutions devoid of peroxide and molecules-136 and -208 (see method section). **Test:** photo-exposed solutions devoid of peroxide but containing molecules-136 and -208 (see method section). There was a significant interaction ( $p < 0.05$ ) between parameters. Hepatic ACC activities were affected ( $p < 0.01$ ) by the dose (1 vs 5%) only in animals receiving test solutions and only in presence of glutamate. Mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 4$ . \*\* :  $p < 0.01$ .

**Figure 8. Urinary abundances of ions  $m/z = 135, 191, 207$ .**

1% = 0.9 mM ascorbic acid + 15  $\mu$ M riboflavin; 5% = 4.5 mM ascorbic acid + 75  $\mu$ M riboflavin; these concentrations correspond to the amount of vitamins reported in 1 and 5% parenteral multivitamin. **C (control):** photo-protected solutions devoid of peroxide and molecules-136 and -208 (see methods section). **T (test):** photo-exposed solutions devoid of peroxide but containing molecules-136 and -208 (see methods section). **Dotted lines** (mean  $\pm$  S.E.M) represent abundances of ions in urine from animal receiving the base solution devoid of vitamins. Abundances of  $m/z = 135, 191$  and  $207$ , normalized for creatinine, were higher ( $p < 0.05$ ) in urines from animals receiving the 5% vitamins, whereas only  $m/z = 135$  and  $207$  were increased ( $p < 0.01$ ) in test (T) groups. Mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 4$ . \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ .

**Figure 9. Activation of ACC in functions of by-products of vitamin C.**

Activation of ACC = ratio of activity measured in the presence or absence of glutamate. Panel A: The activation was linearly correlated ( $r^2 = 0.67$ ,  $p < 0.01$ ) with the urinary abundance of  $m/z = 207$ . Panel B: **1%** = 0.9 mM ascorbic acid + 15  $\mu$ M riboflavin; **5%** = 4.5 mM ascorbic acid + 75  $\mu$ M riboflavin; these concentrations correspond to the amount of vitamins reported in 1 and 5% parenteral multivitamin. **Control**: photo-protected solutions devoid of peroxide and molecules-136 and -208 (see methods section). **Test**: photo-exposed solutions devoid of peroxide but containing molecules-136 and -208 (see methods section). The activation was higher ( $p < 0.01$ ) in 5% solutions. Mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 4$ . \*\* :  $p < 0.01$ .

**Figure 10. Proposed pathway of  $H_2O_2$ -dependent oxidation of dehydroascorbic acid (DHA) leading to molecules-208 and -136.** MW: molecular weight;  $m/z$ : mass over charge (refer to mass spectrum on figures 2-5).

**Figure 11. Proposed chemical fragmentation of threonic acid and molecule-136 on tandem mass spectrometer.** Upper panel (A), from threonic acid; lower panel (B), from molecule-136. MW: molecular weight;  $m/z$ : mass over charge (refer to mass spectrum on figure 6).

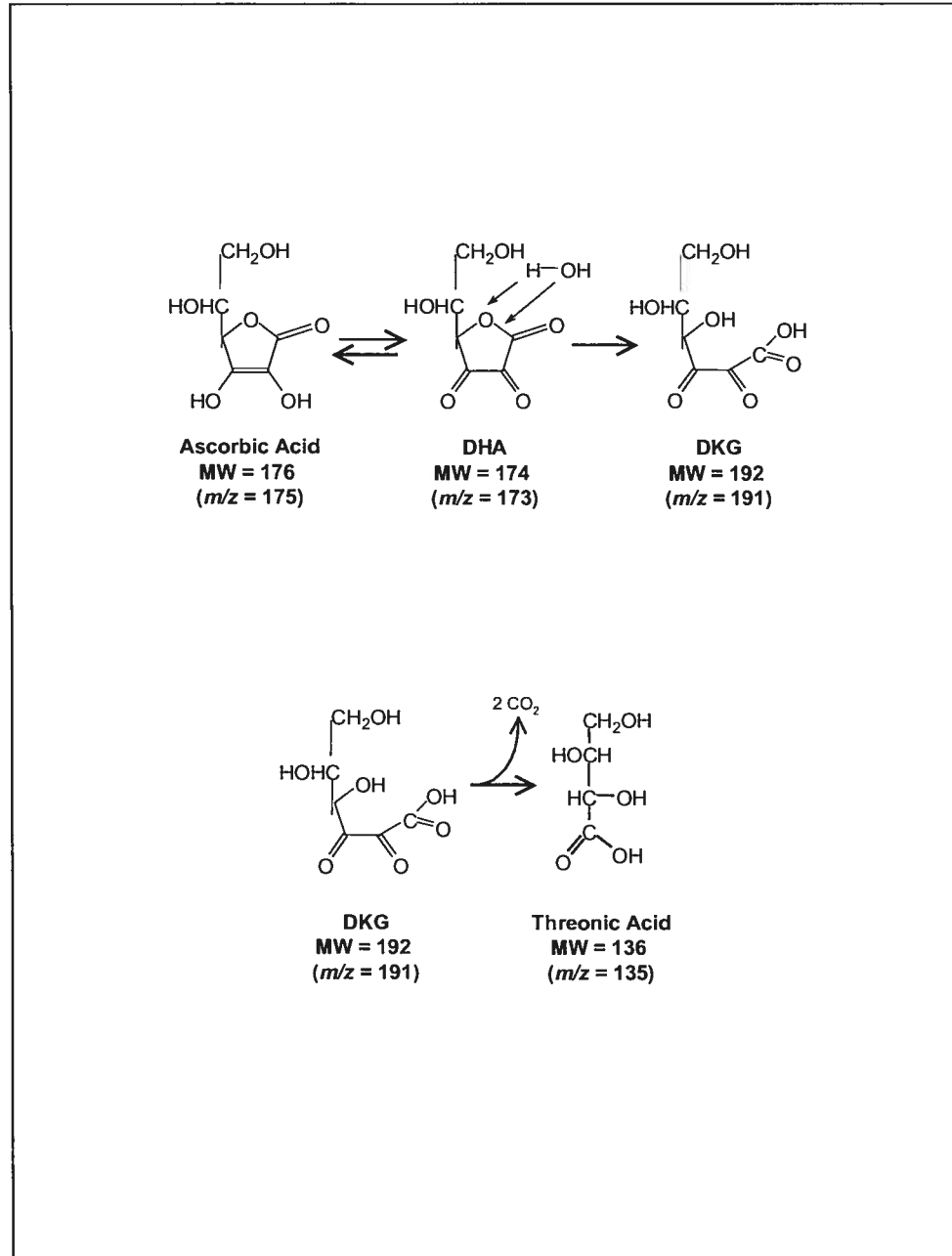


Figure 1

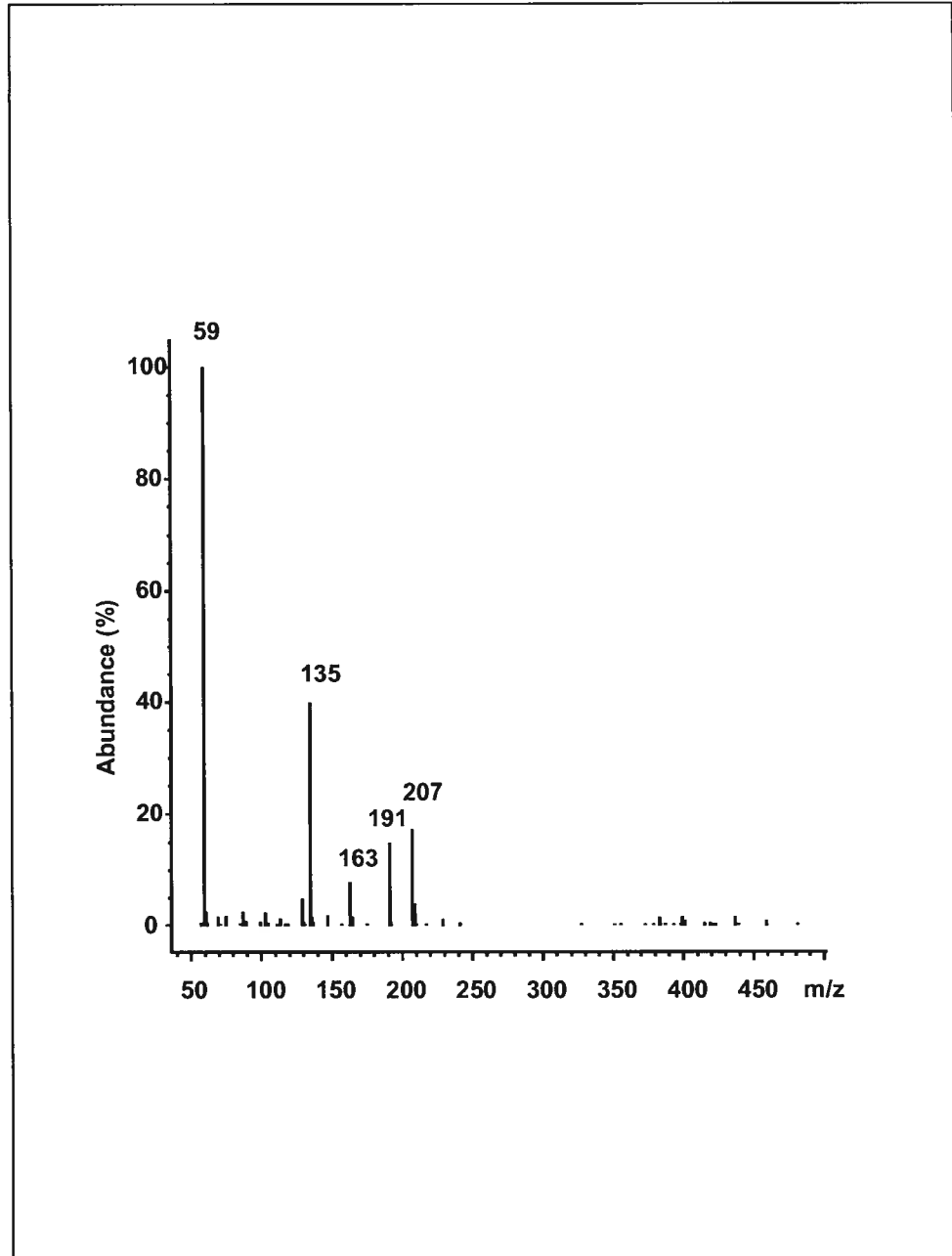


Figure 2

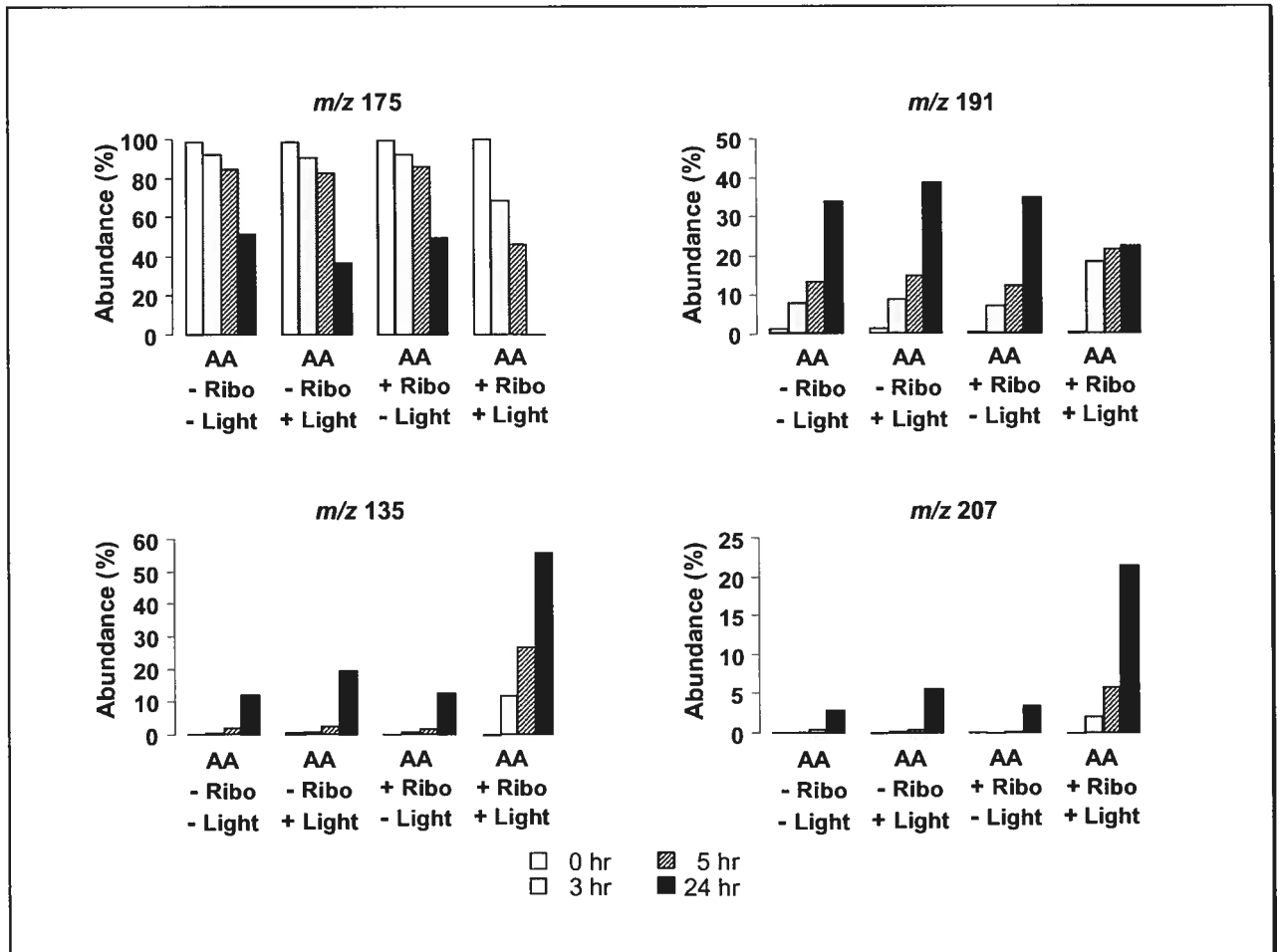


Figure 3

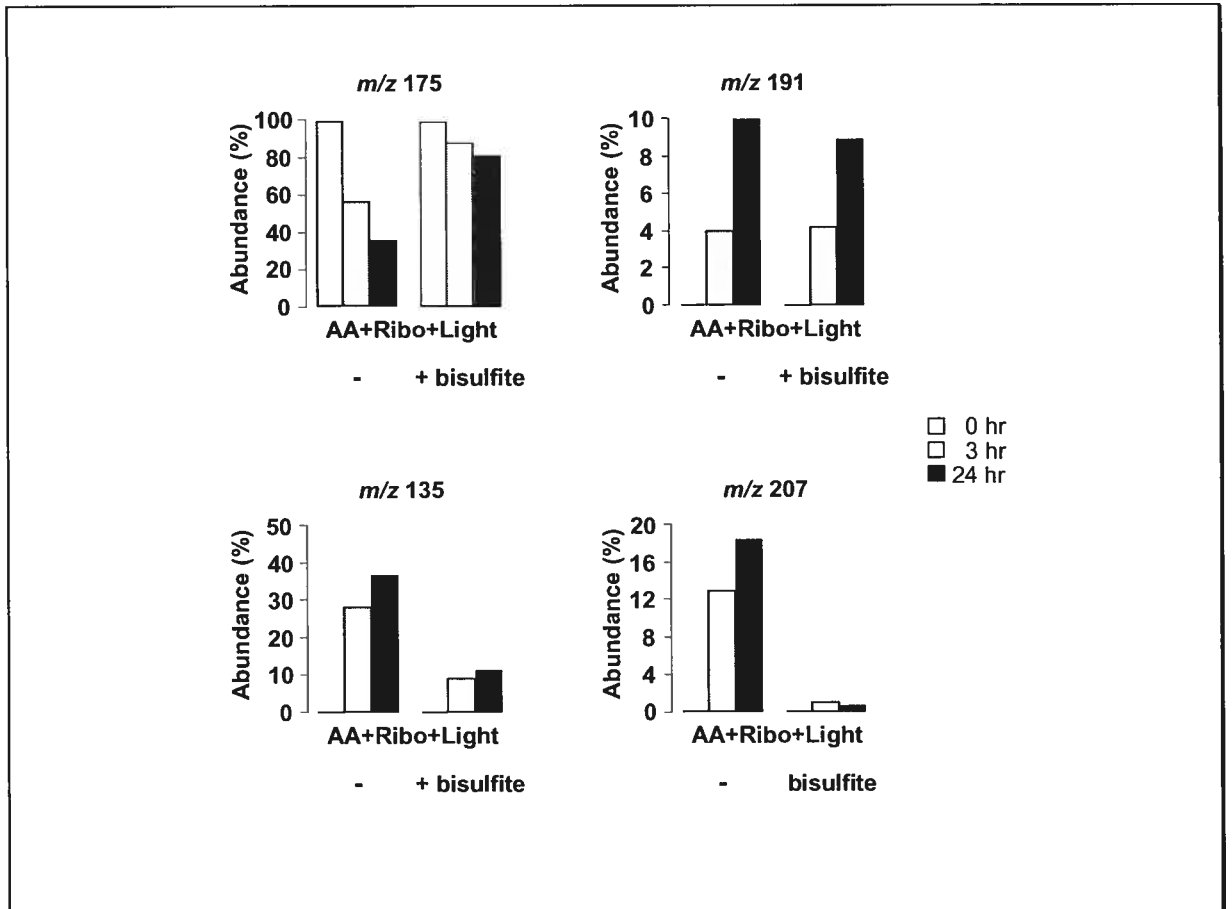


Figure 4



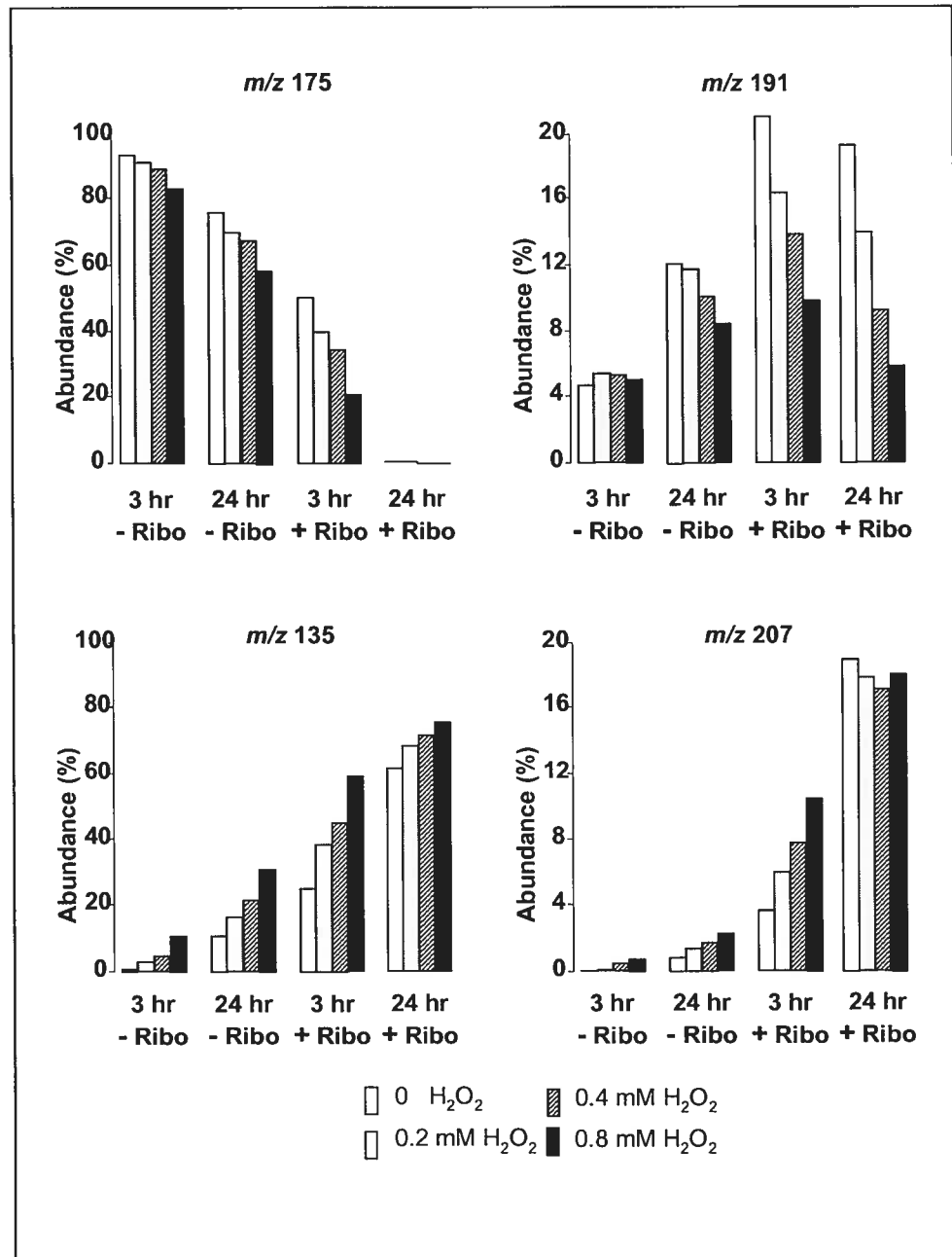


Figure 5

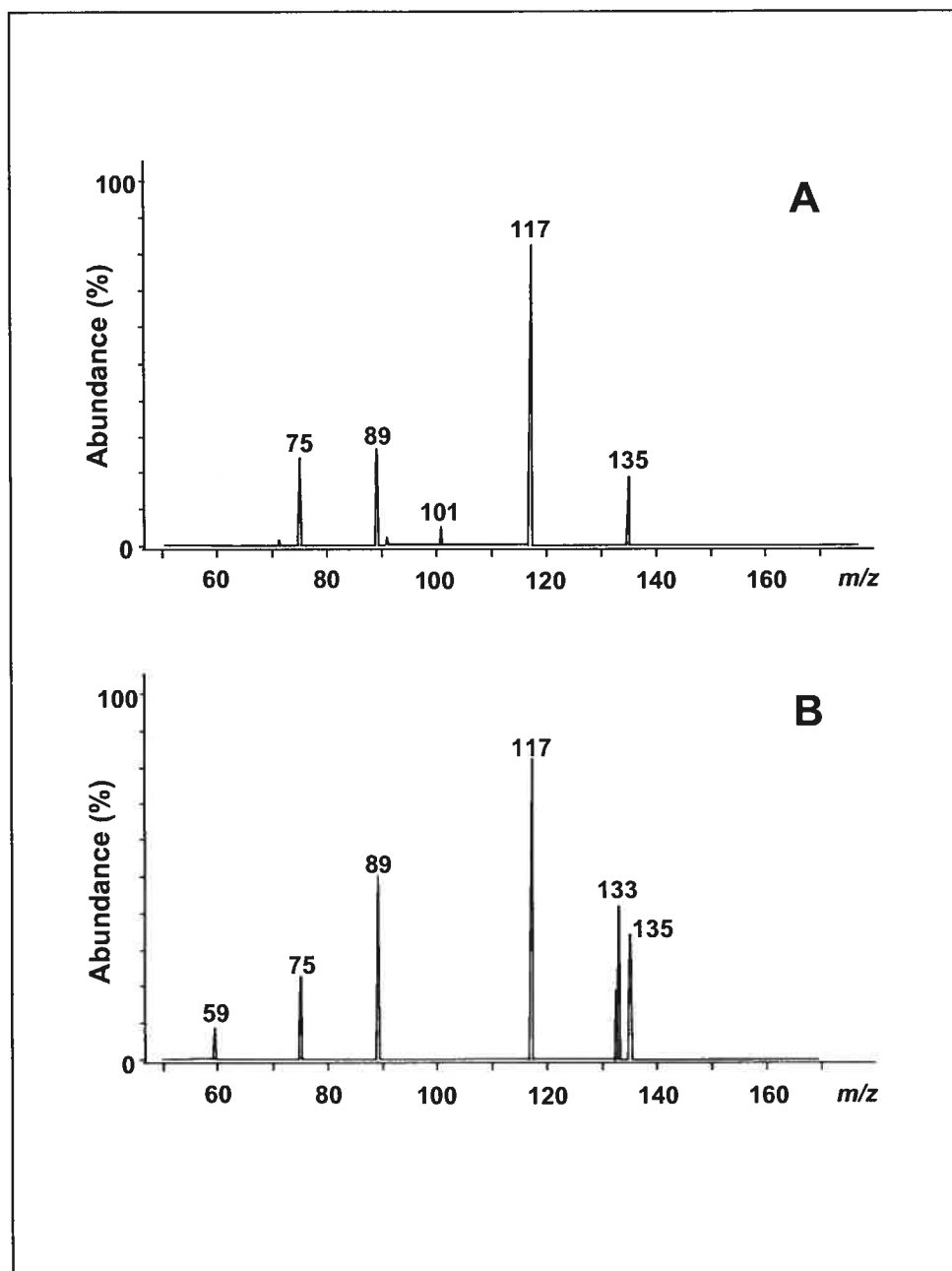


Figure 6

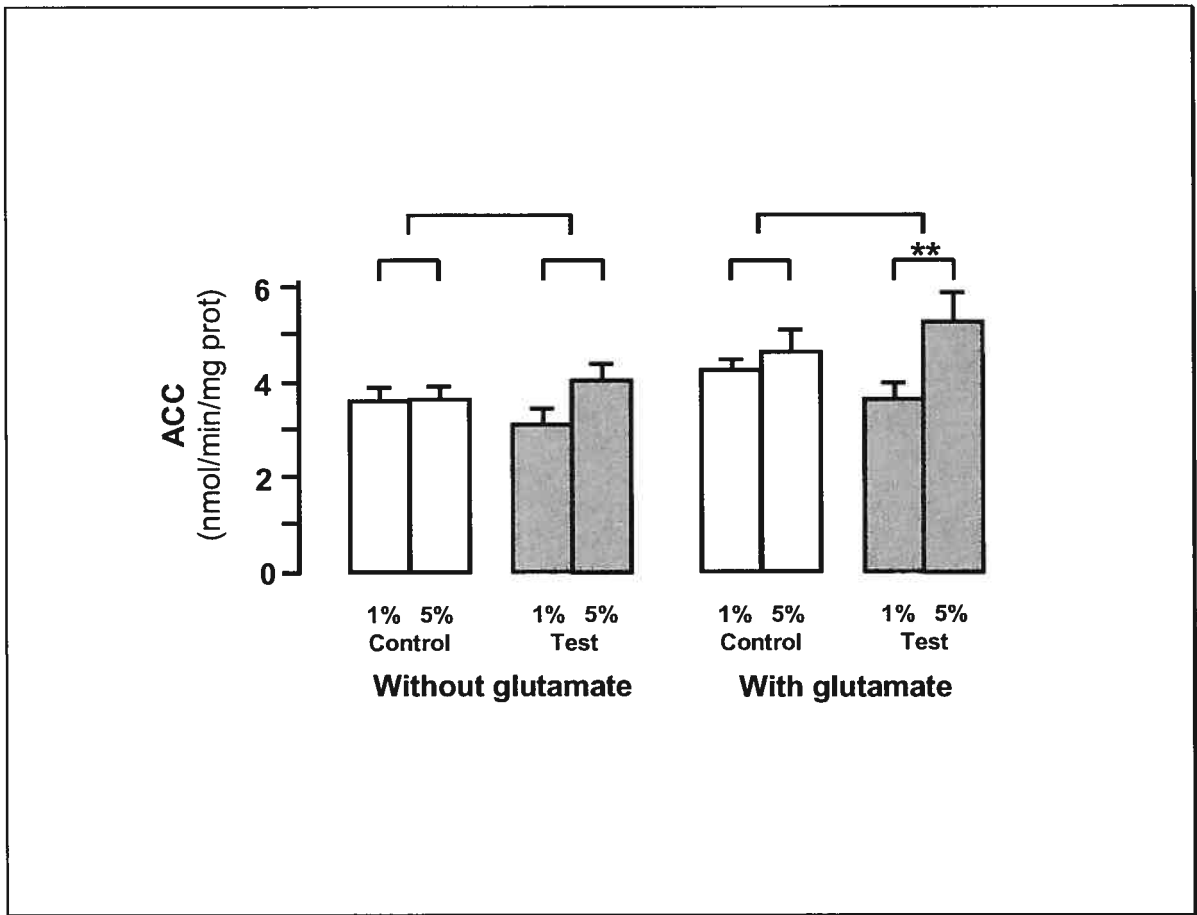


Figure 7

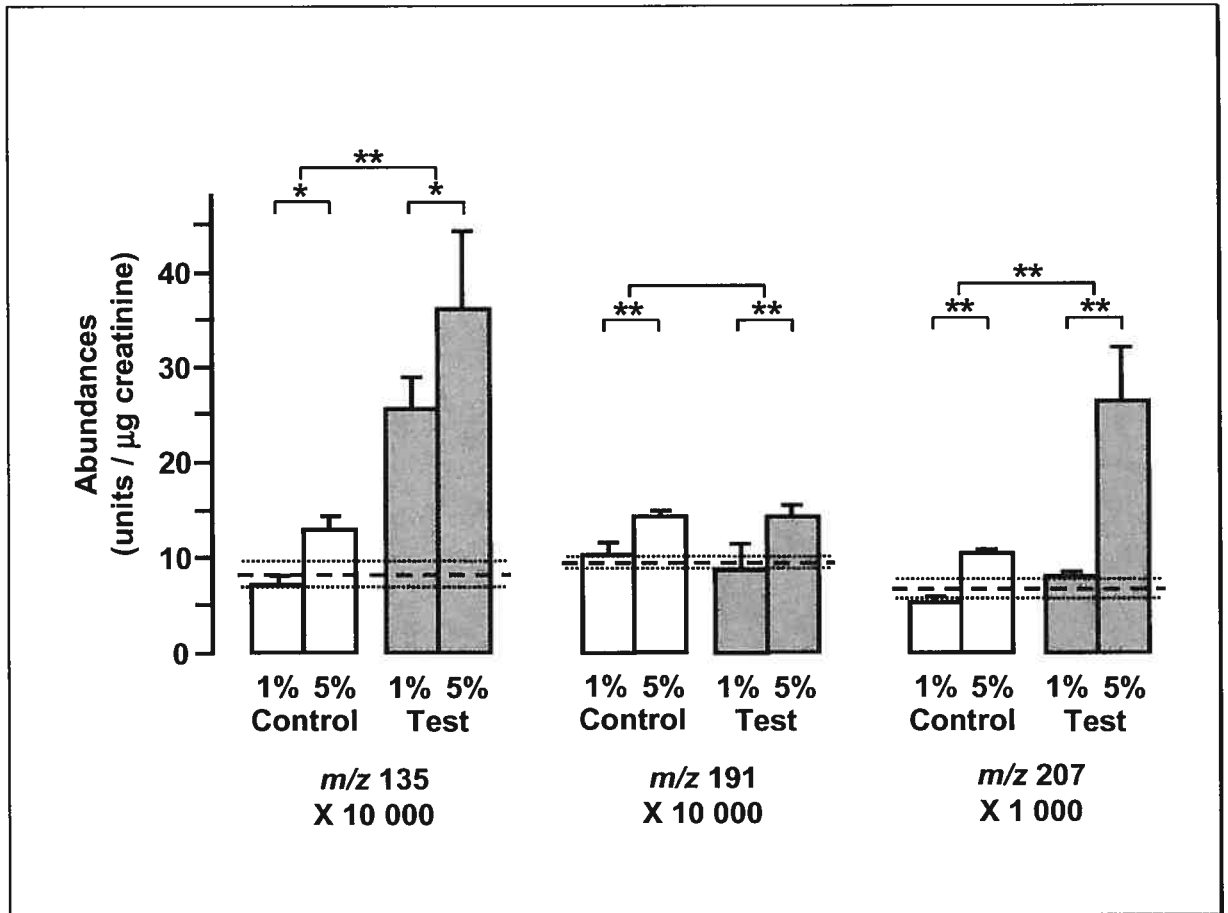


Figure 8

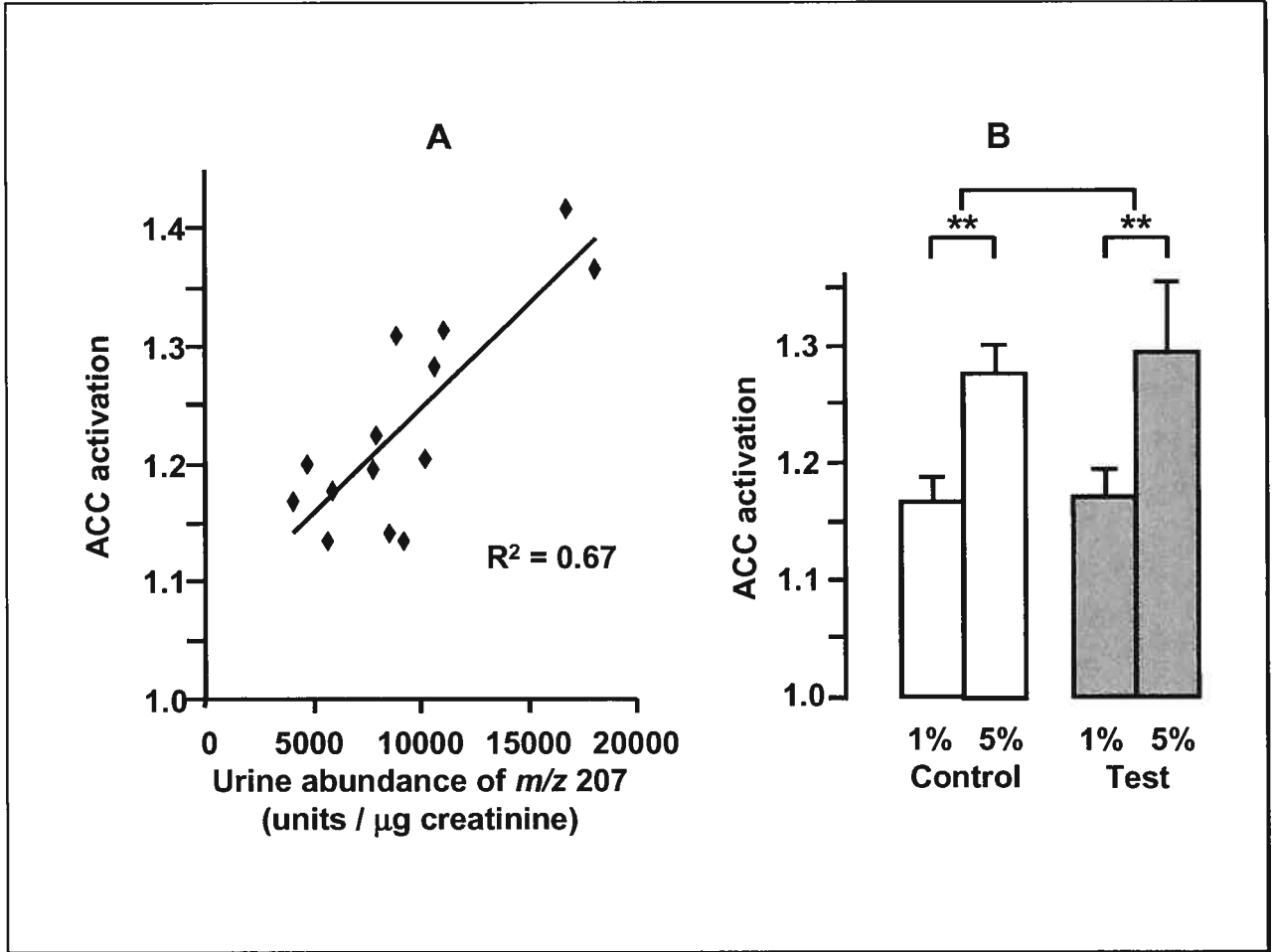


Figure 9

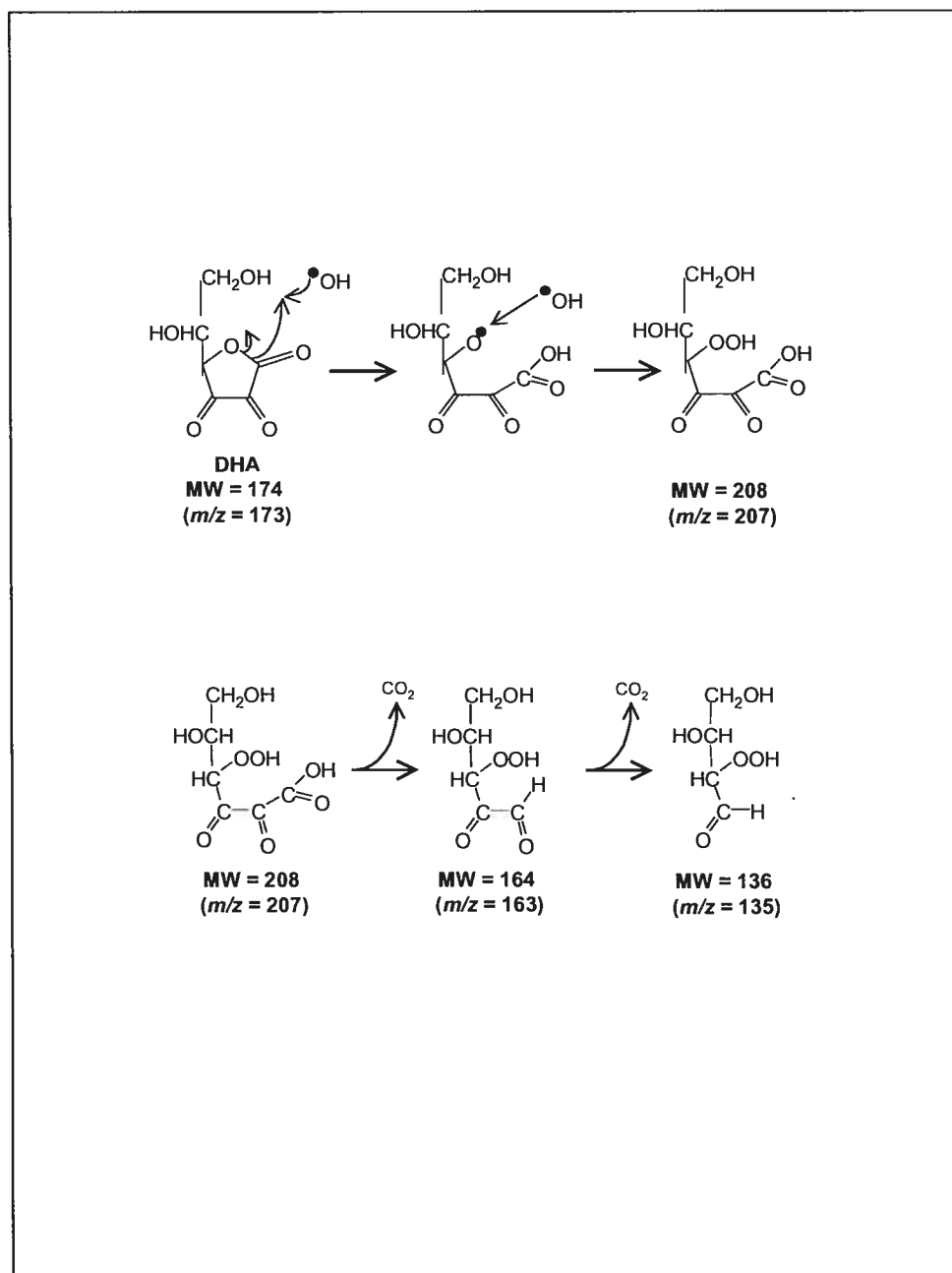


Figure 10

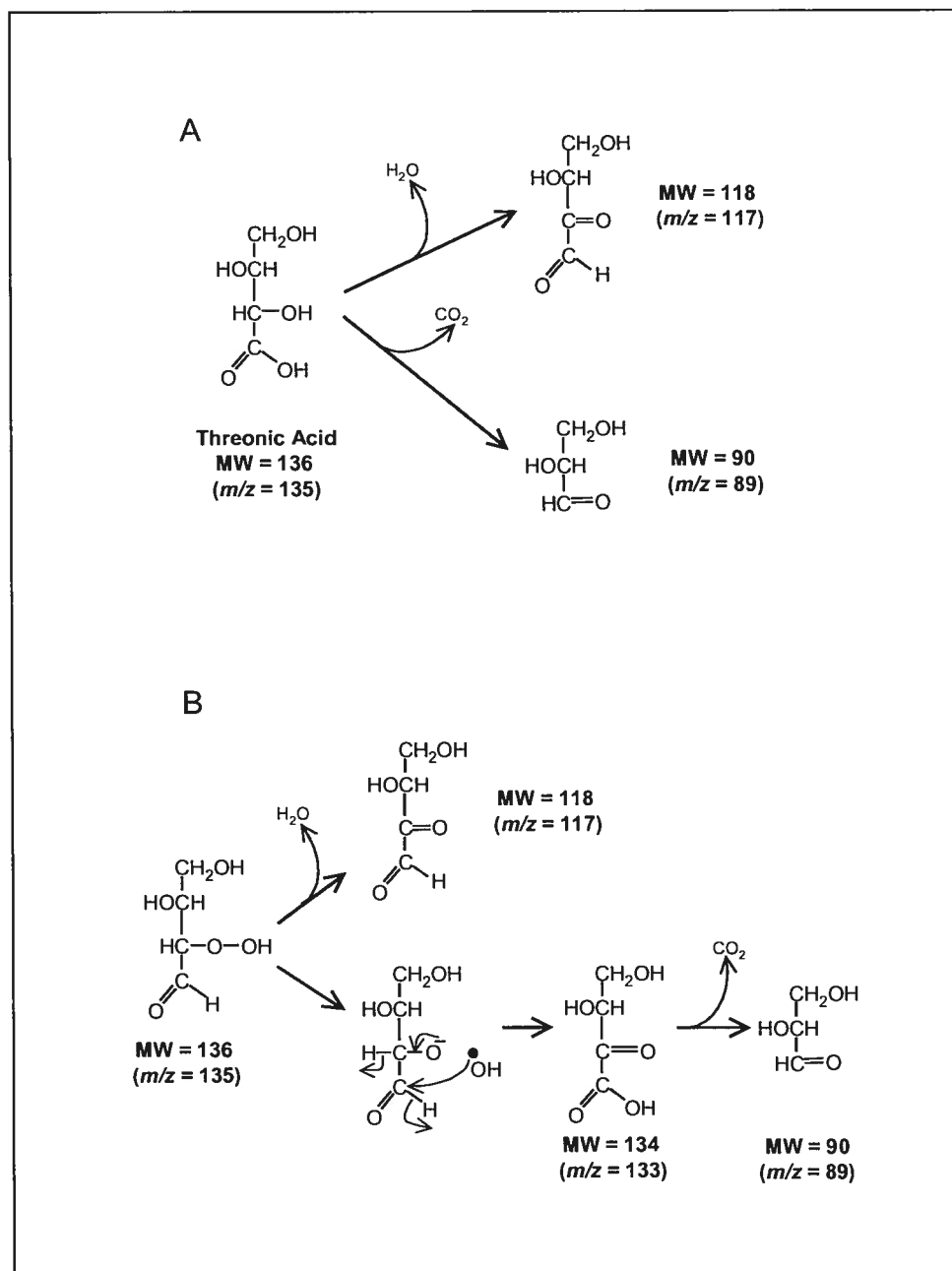


Figure 11

## **4-MATÉRIEL ET MÉTHODES**



#### 4.1-Matériel :

##### I- Le redox : GSH et GSSG (par électrophorèse capillaire)

- Acide métaphosphorique, Fisher, St-Laurent, QC, Canada
- Glutathion réduit (GSH), Roche, Laval, QC, Canada
- Glutathion oxydé (GSSG), Roche, Laval, QC, Canada
- Tubes capillaires eCAP, Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada
- Bis-Tris, Fluka, Sigma, Oakville, ON, Canada
- Acide Borique, Sigma, Oakville, ON, Canada

##### II- Dosage de l' AMPK

- Tris-HCL, Roche, Laval, QC, Canada
- Mannitol, EMD, NJ, USA
- Fluorure de sodium (NaF), Roche, Laval, QC, Canada
- Pyrophosphate de sodium, Fisher, St-Laurent, QC, Canada
- EDTA, Roche, Laval, QC, Canada
- EGTA, Roche, Laval, QC, Canada
- Dithiothreitol (DTT), Roche, Laval, QC, Canada
- PMSF, Sigma, Oakville, ON, Canada
- Soybean trypsin inhibitor, Sigma, Oakville, ON, Canada
- Benzamidine, Sigma, Oakville, ON, Canada
- Polyéthylène glycol 8000 (PEG 8000), Sigma, Oakville, ON, Canada
- Sodium azide, Sigma, Oakville, ON, Canada
- Glycérol, BDH, Toronto, ON, Canada
- HEPES, A&C Chemicals, Montréal, QC, Canada
- Chlorure de sodium (NaCl), BDH, Toronto, ON, Canada
- Chlorure de magnésium ( $MgCl_2$ ), J.T.Baker, TekniScience, Terrebonne, QC, Canada
- ATP-( $\gamma$ -32P), Amersham, Baie d'Urfé, QC, Canada
- 5'-AMP, Sigma, Oakville, ON, Canada
- peptide SAMS, Synthèse de peptides de l'est du québec, Québec, QC, Canada
- Acide phosphorique,  $H_3PO_4$ , Fisher, St-Laurent, QC, Canada
- Acétone, Fisher, St-Laurent, QC, Canada

##### III- Dosage de la TGH

- Tris-HCL, Roche, Laval, QC, Canada
- Sucrose, Fisher, St-Laurent, QC, Canada
- EDTA- $Na_2$ , Roche, Laval, QC, Canada
- Taurodéoxycholate, Steraloids Inc, Rhode Island, USA
- 4-méthylumbelliféron, sodium salt, Sigma, Oakville, ON, Canada
- 4-méthylumbelliferyl heptanoate, Sigma, Oakville, ON, Canada
- Tétrahydrofuran, AlliedSignal, MI, USA

**IV- Dosage des triglycérides plasmatiques et hépatiques**

- Kit de dosage des triglycérides, Roche, Laval, QC, Canada
- Standard de précimat glycérol, Roche, Laval, QC, Canada
- Thésit, Fluka, Sigma, Oakville, ON, Canada
- Methanol, Fisher, St-Laurent, QC, Canada
- Chloroforme, Fisher, St-Laurent, QC, Canada

## 4.2-Méthodes:

### I- Le statut redox : GSH et GSSG

La quantification du GSH et du GSSG se fait par électrophorèse capillaire <sup>105</sup>.

#### *Principe :*

La technique de l'électrophorèse capillaire consiste à séparer des espèces chimiques, sous l'influence d'un champ électrique, dans un capillaire de faible diamètre. Il existe 2 phénomènes qui agissent simultanément pour déplacer et séparer les molécules : l'électro-migration et l'électro-osmose.

#### Préparation des échantillons de foie

0.5 g de foie fraîchement prélevé est homogénéisé sur glace avec un polytron dans 2.5ml d'une solution d'acide métaphosphorique (MPA) 5% pendant environ 2 périodes de 30 secondes. L'homogénat est ensuite centrifugé 3 minutes à 5500xg et le surnageant prélevé est conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse. Le MPA permet de précipiter les protéines et de stabiliser le glutathion réduit.

#### *Dosage :*

Le jour du dosage, les échantillons de foie sont dégelés sur glace et dilués 1/5 dans de l'eau HPLC afin d'amener la concentration finale de MPA à 1%.

L'instrument utilisé est le P/ACE<sup>TM</sup> MDQ de Beckman Coulter (Palo Altos, Californie, USA).

Pour la séparation, nous avons utilisé un capillaire eCAP (Beckman Coulter) de silice fondue avec un diamètre interne de  $75\mu\text{m}$ , une longueur totale de 57 cm et une longueur effective de 50 cm jusqu'au détecteur. La température du capillaire est maintenue à  $28^{\circ}\text{C}$  durant toute la séparation, qui se fait à un voltage constant de 18kV, pendant 10 minutes. La détection se fait à 200nm. Le tampon de séparation est composé de Bis-Tris (25mM) et d'acide borique (75mM) à pH8.4. Il est changé à toutes les 6 séparations, pour préserver les conditions de séparation entre chaque échantillon.

L'introduction de l'échantillon se fait par faible pression hydrodynamique de 0.5psi, pendant 10 secondes, ce qui correspond à un volume injecté d'environ 50nL.

Les concentrations de GSH et de GSSG sont quantifiées à l'aide de courbes étalons de GSH (0 à 250µM) et de GSSG (0 à 10µM).

Il existe 2 formes de glutathion libre : la forme réduite GSH et la forme oxydée GSSG.

La concentration de glutathion totale se calcule de la façon suivante :  $(GSH + (2 \times GSSG))$ . Cela tient compte des 2 formes de glutathion présentes et s'exprime en équivalent GSH. Ce qui explique pourquoi on multiplie par 2 la concentration de GSSG, qui correspond en réalité à 2 molécules de GSH.

Le statut redox quant à lui, se calcule avec l'équation suivante :

$$\frac{GSSG}{(GSH + (2 \times GSSG))} \times 100.$$

## II- dosage de l'AMPK

### *Extractions :*

Environ 200mg de foie congelé sont homogénéisés 30 secondes sur glace, dans un tampon d'homogénéisation Tris-HCL pH 7.5 (50mM) contenant du mannitol (250mM), NaF (50mM), pyrophosphate de sodium (5mM), DTT (1mM), EDTA (1mM), EGTA (1mM) ainsi que les inhibiteurs de protéases suivants : PMSF (1mM), STI (4µg/ml), et benzamidine (1mM). Toutes les étapes subséquentes se font à 4°C.

Les homogénats sont centrifugés à 14,000xg pendant 20 minutes. On prélève le surnageant auquel on ajoute une solution concentrée de polyéthylène glycol 8000 (PEG 8000) pour obtenir une concentration finale de 2.5%. On agite 10 minutes à 4°C puis on centrifuge à nouveau à 10,000xg, 10 minutes. On prélève le surnageant mais cette fois-ci on porte la concentration de PEG 8000 à 6%. Après 10 minutes d'agitation, on centrifuge à 10,000xg pendant 10 minutes, et on récupère le culot qui est lavé avec le tampon d'homogénéisation qui contient 6% de PEG. Après une centrifugation finale à 10,000xg pendant 10 minutes, le culot est re-suspendu avec 0.5ml de tampon de suspension Tris-HCL 100mM, pH 7.5 qui est composé de NaF (50mM), pyrophosphate de sodium (5mM), EDTA (1mM),

EGTA (1mM), DTT (1mM), STI (4µg/ml), Benzamidine (1mM), Sodium azide (0.02%) et Glycérol (10%).

20µl de cette suspension sont prélevées pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford.

*Principe :*

Il est basé sur l'incorporation de  $^{32}\text{P}$ , sous l'action de l'AMPK <sup>94</sup>, sur un peptide synthétique SAMS dont la séquence d'acides aminés est la suivante : **HMRSAMSGLHLVKRR**. Ce peptide correspond à une séquence consensus de l'ACC phosphorylé par l'AMPK au résidu de Sérine 79. L'activité de l'AMPK étant stimulée par le 5'-AMP, on mesure l'activité de cette enzyme en présence et en absence du 5'-AMP afin de déterminer son potentiel d'activation.

*Dosage :*

Il s'effectue sur 4µg de protéines issue de la fraction 6% de PEG 8000, dans un volume total de 25µl de tampon de réaction qui comprend HEPES-NaOH (40mM) pH7.0, NaCl (80mM), glycérol (8%), EDTA (0.8mM), DTT (0.8mM), SAMS (200µM). Le dosage se fait en présence et en absence de 200µM de 5'-AMP. Après une pré-incubation de 15 minutes à 30°C, la réaction est initiée dès l'ajout d'ATP- $\lambda$ - $^{32}\text{P}$  (200µM) et de  $\text{MgCl}_2$  (5mM). À la fin de la réaction de 5 minutes, on prélève 15µl que l'on applique sur un carré de phosphocellulose (Whatman P81) de 1cm<sup>2</sup>, qu'on laisse sécher 1 heure. Les filtres sont placés dans des tubes à scintillation, lavés 4 fois 20 minutes avec une solution 150mM de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  et une fois dans l'acétone. Une fois sec, on ajoute 4ml de liquide à scintillation et la radioactivité est mesurée avec un compteur bêta.

L'activité de l'AMPK est exprimée en terme de picomoles de  $^{32}\text{P}$  incorporés dans le peptide SAMS, par minute, et par milligramme de protéines.

### **III- dosage de la TGH**

#### *Principe :*

L'activité de cette enzyme <sup>104</sup> dans les microsomes hépatiques se mesure à l'aide du substrat fluorescent 4-méthylumbelliferyl heptanoate (MUH). La TGH coupe le lien qui relie l'acide gras heptanoate du MUH libérant le 4-méthylumbelliferyl. Ce dernier émet alors de la fluorescence à une longueur d'onde de 460nm.

#### *Extraction :*

Environ 500mg de foie sont homogénéisés sur glace dans un tampon composé de Tris-HCL pH7.4 (10mM), sucrose (0.25M), et EDTA-Na<sub>2</sub> (2mM). Après une centrifugation à 1000xg à 4°C pendant 20 minutes, le surnageant est centrifugé 10 minutes à 12,000xg. Le culot est re-suspendu dans 1ml de tampon d'homogénéisation et centrifugé 10 minutes à 12,000xg. Les deux surnageants sont combinés et centrifugés à 100,000xg pendant 60 minutes. Le culot est re-suspendu dans 0.5ml de tampon puis congelé à -80°C jusqu'au jour du dosage. 20µl sont prélevés pour le dosage des protéines.

#### *Dosage :*

À 1µg de protéines microsomales, on ajoute 2.5µM de MUH, préparé dans du tétrahydrofuran, dans un volume final de 1ml d'un tampon de réaction composé de Tris-Hcl pH 8.0 (20mM), EDTA-Na<sub>2</sub> (1mM) et taurodéoxycholate (300µM). On mesure immédiatement la fluorescence à chaque minute pendant 10 minutes à l'aide d'un fluorimètre réglé à une longueur d'onde d'excitation de 355nm et une longueur d'onde d'émission de 460nm. Les calculs se font à partir des pentes des courbes obtenues et d'une courbe standard préparée avec du sel sodique 4-méthylumbelliféron.

### **IV -dosage des triglycérides plasmatiques et hépatiques**

Ce dosage utilise un réactif présent dans un kit commercial de dosage des TG de Roche.

*Principe :*

C'est un test enzymatique qui fait appel à une lipoprotéine-lipase de micro-organismes pour hydrolyser rapidement et complètement les TG en glycérol et en acides gras. La cascade de réactions chimiques subséquentes donne la formation d'un dérivé coloré rouge.

Le protocole a été adapté pour le dosage des TG plasmatiques et des TG hépatiques. On utilise une solution de glycérol pour la courbe étalon.

*Dosage des TG Plasmatiques :*

On ajoute 1 ml de réactif directement à 10 $\mu$ l de plasma. Après 10 minutes d'incubation à température pièce, on mesure l'absorbance sur un spectrophotomètre à 500nm.

*Dosage des TG hépatiques :*

On homogénéise environ 0.5 g de tissu dans une solution saline 0.9%. On prélève 20 $\mu$ l pour le dosage des protéines tandis que 100 $\mu$ l de cet homogénat subit une extraction avec 2 ml d'une solution de Folch (chloroforme/méthanol 2 :1, v/v).

Après 1 heure d'agitation, on porte à 20% la proportion de salin, et on centrifuge à 2500xg, 10 minutes. La phase inférieure est évaporée à sec sous azote et re-suspendue dans 100 $\mu$ l de Folch. On y ajoute 125 $\mu$ l d'une solution de Thésit (20% dans chloroforme) et le mélange est évaporé à nouveau. On re-suspend le culot avec 1,25ml d'eau et 50 $\mu$ l sont utilisés pour le dosage qui se fait également avec 1ml de réactif.

## **5-RÉSULTATS**



Nous avons mesuré l'activité de 3 enzymes, impliquées dans la régulation du métabolisme des lipides, chez le cochon d'inde qui reçoit l'une des 2 concentrations d'un mélange d'acide ascorbique et de riboflavine exposé (**T**) ou non (**C**) à la lumière.

Comme déjà mentionné dans le manuscrit, nous avons observé un effet dose (1% vs 5%) sur l'activité de l'ACC seulement pour les solutions test, c'est-à-dire exposées à la lumière (figure 7). L'ACC est activée par une phosphatase, la PP2A, dont l'action est facilitée par la présence de glutamate. Nous avons mesuré les ratios de l'activité de l'ACC en présence et en absence de glutamate. Celle-ci n'est significativement influencée que par l'effet concentration en vitamines, pas par l'effet lumière (figure 9).

L'AMPK, une kinase qui inhibe l'ACC, nonobstant la présence de 5'-AMP, est significativement stimulée ( $p < 0.01$ ) par la concentration du mélange vitamine C (1% vs 5%) et riboflavine. L'analyse factorielle des résultats a révélé une interaction significative ( $p < 0.01$ ) entre la concentration en vitamines et la lumière. Ce type d'analyse nous a ensuite permis d'analyser séparément l'effet de la lumière pour chacune des concentrations. L'effet lumière n'est observé que chez les cochons d'inde qui reçoivent la solution de vitamine C plus concentrée ( $p < 0.01$ ) (figure 13). Cette analyse statistique ne nous permettant plus la comparaison entre les différentes concentrations, mais il est évident en regardant les résultats que l'activité de l'AMPK est beaucoup plus grande à la plus haute concentration en vitamines (5%).

L'activité de la TGH (figure 14), une enzyme qui hydrolyse les triacylglycérol en TG, est également stimulée ( $p < 0.01$ ) par la concentration en vitamine C et riboflavine, indépendamment de la lumière. Ces enzymes, impliquées dans le contrôle du métabolisme des lipides, ultimement influencent les niveaux de triglycérides plasmatique et hépatique. Nous avons observé une baisse des niveaux de TG (figure 15) dans ces 2 compartiments aux concentrations en vitamines plus élevées, mais pas d'effet lumière.

La perfusion des mélanges de vitamines C et Rf exposés à la lumière, auxquels nous avons éliminé le  $H_2O_2$ , n'a pas influencé les niveaux de glutathion total hépatique ( $2.42 \pm 0.51$  mmol/mg;  $n=16$ ). Par contre, le statut redox a diminué (*figure 16*) avec les solutions exposées à la lumière mais augmenté ( $p < 0.05$ ) en fonction de la concentration en vitamines. Les produits issus de la dégradation semble donc avoir un effet réducteur.

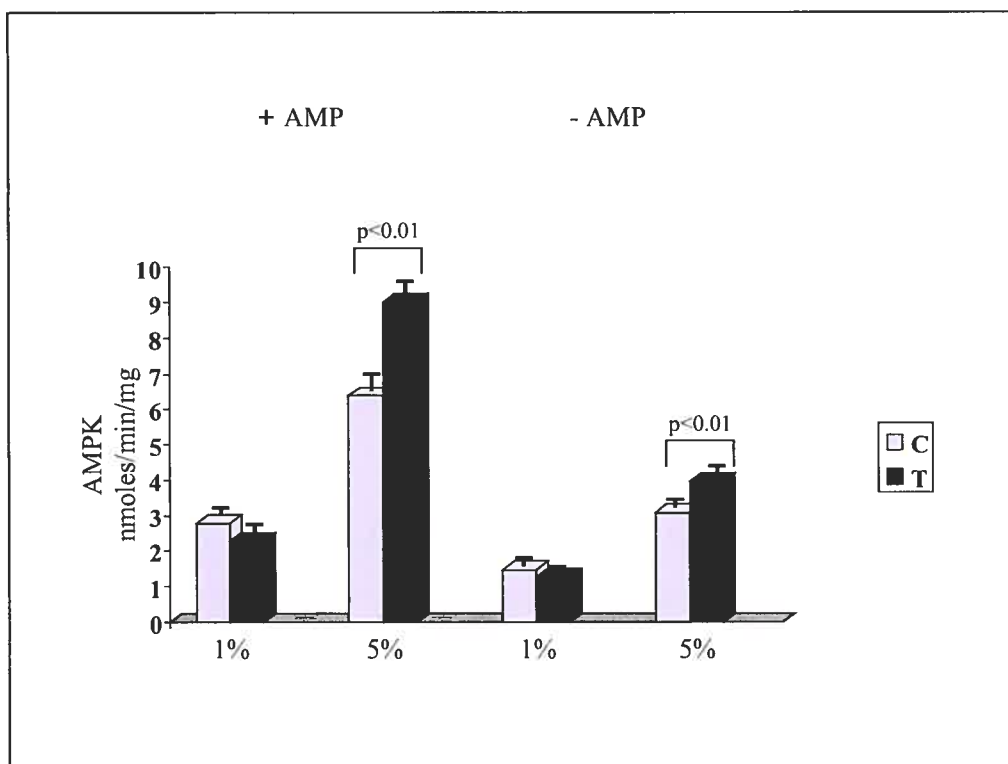


Figure 13 : Effet des solutions de vitamine C, 1 et 5%, exposées(T) ou non(C) à la lumière, sur l'activité de l'AMPK, en présence ou non de l'activateur 5'-AMP. Les résultats sont exprimés selon la moyenne  $\pm$  SEM,  $n=4$  pour chaque groupe.

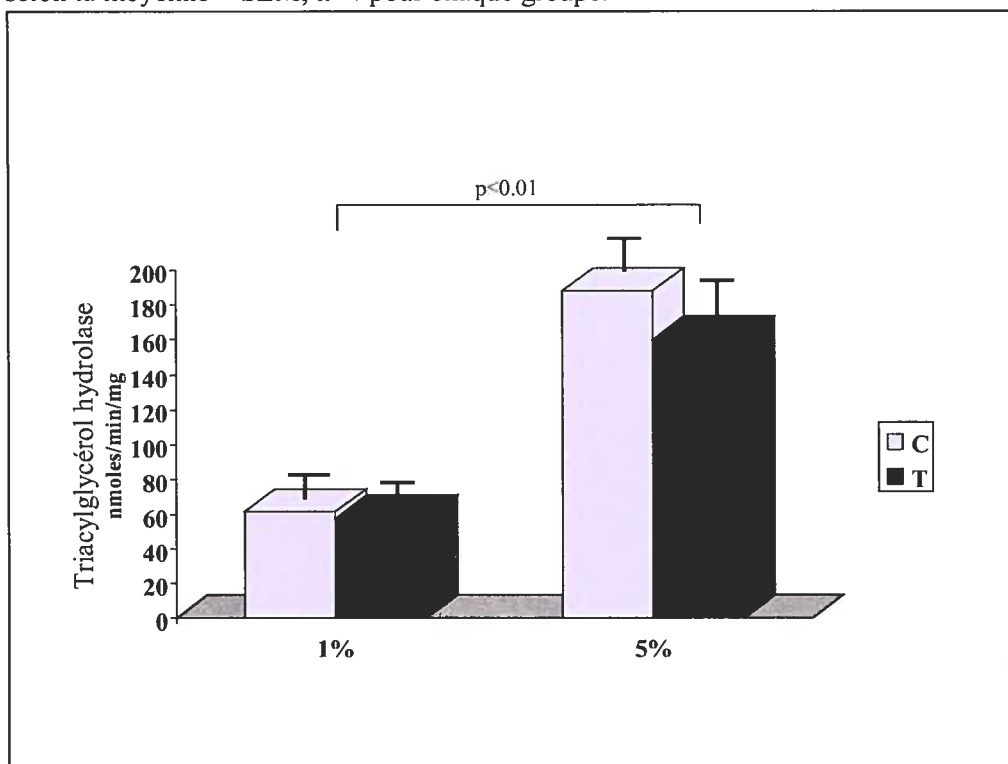


Figure 14 : Effet des solutions de vitamine C 1 et 5%, exposées(T) ou non(C) à la lumière, sur l'activité de la triacylglycéról hydrolase. Les résultats sont exprimés selon la moyenne  $\pm$  SEM,  $n=4$  pour chaque groupe.

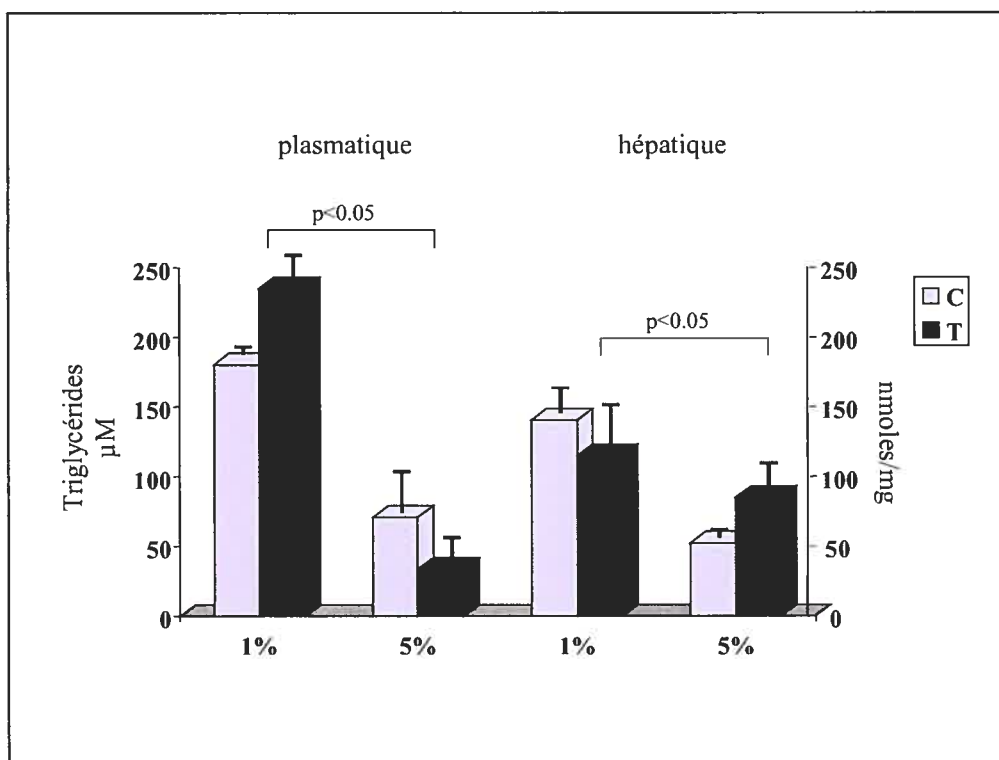


Figure 15 : Effet des solutions de vitamine C, 1 et 5%, exposées(T) ou non(C) à la lumière, sur les niveaux de triglycérides plasmatiques et hépatiques. Les résultats sont exprimés selon la moyenne  $\pm$  SEM,  $n=4$  pour chaque groupe.

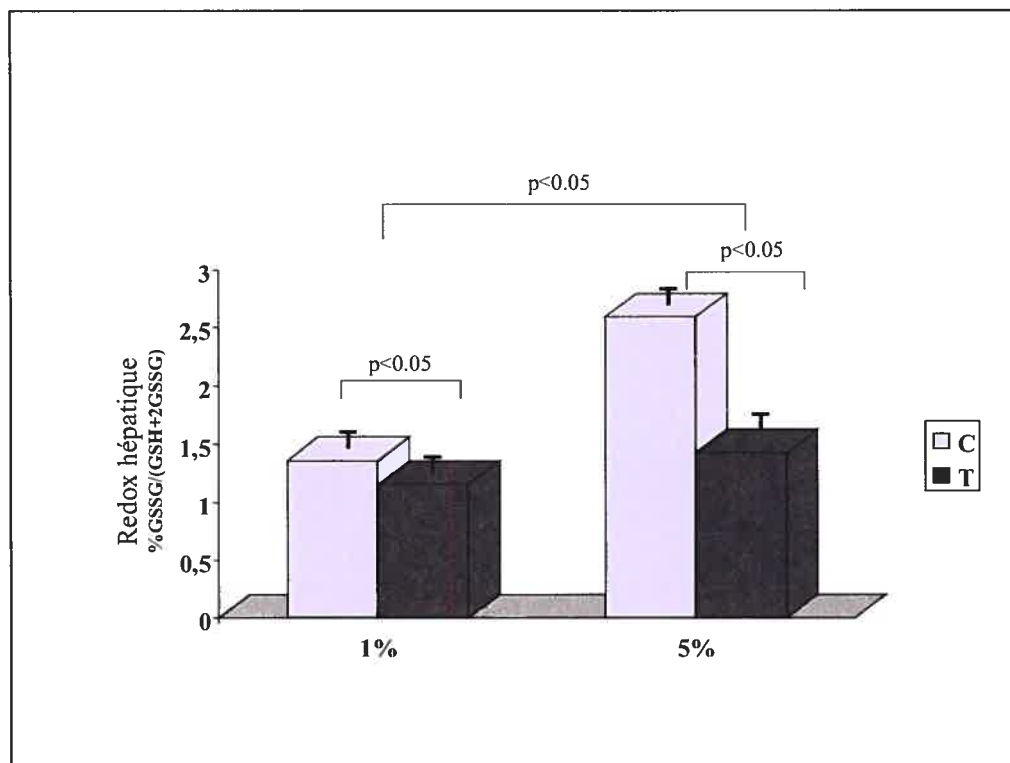


Figure 16 : Effet des solutions de vitamine C, 1 et 5%, exposées(T) ou non(C) à la lumière, sur le statut redox hépatique. Les résultats sont exprimés selon la moyenne  $\pm$  SEM,  $n=4$  pour chaque groupe.

**6-DISCUSSION**

Les solutions de nutrition parentérale (NP) exposées à la lumière entraînent des dérèglements dans le métabolisme des lipides, observés par l'accumulation de triglycérides dans le foie. Nous voulions vérifier l'hypothèse que le  $H_2O_2$ , présent dans les solutions de nutrition parentérales, initie la peroxydation de la vitamine C et la génération de sous produits potentiellement hépato-toxiques qui affectent le métabolisme des lipides hépatiques.

Nous avons tenté d'isoler la ou les molécules issues de la dégradation de la vitamine C qui seraient responsables de ce dérèglement, de comprendre les mécanismes réactionnels de leur formation et tenter de comprendre leur mode d'action.

Chez les nouveaux-nés, le gras représente 16% de la masse corporelle. Cette accumulation s'effectue principalement pendant le dernier trimestre <sup>106</sup> de la vie intra-utérine. Il y a deux facteurs qui y contribuent : (1) 70% du glucose sont convertis en gras. Le glucose est la principale source d'énergie du fœtus et traverse plus facilement le placenta. (2) La bêta oxydation étant également plus faible, les acides gras maternels qui traversent le placenta sont principalement utilisés pour la formation de triglycérides dans le foie. La résultante de cela est que le fœtus développe un foie gras <sup>107</sup>. On pourrait alors se demander si l'accumulation de TG observée serait due à une inhibition de l'adaptation du métabolisme lors du passage de la vie fœtal à néonatale c'est-à-dire lorsque l'on passe de la glycolyse à la bêta oxydation pour la production d'énergie. Une lipogénèse soutenue associée à une faible utilisation des TG hépatiques pourrait entraîner une accumulation de TG. Ce switch métabolique semble être contrôlé principalement par les niveaux d'insuline et de glucagon <sup>108</sup>. Il est connu que l'insuline inhibe l'AMPK <sup>103</sup> ce qui a pour conséquence d'activer l'ACC. D'ailleurs on associe, chez les personnes obèses qui accumulent beaucoup de TG dans le foie, une résistance à l'insuline <sup>109</sup>.

Les variations des niveaux hépatiques et plasmatiques des triglycérides peuvent dépendre à la fois de la synthèse des acides gras, de la capacité des cellules à les

exporter, de la  $\beta$ -oxydation dans la mitochondrie et de la lipolyse des TG endogènes par la TGH.

La stéatose qui est observée chez l'animal qui reçoit de la NP exposée à la lumière, ne peut être reproduite par l'infusion de peroxydes seuls<sup>6</sup>. Cela indique que le  $H_2O_2$  présent n'induit pas directement le dérèglement observé du métabolisme des lipides.

Nous avons soupçonné le couple vitamine C et riboflavine pour plusieurs raisons : premièrement, elles sont toutes les deux présentes dans les solutions de multivitamines (MV), laquelle solutions vitaminées font partie intégrantes de la NP. Deuxièmement, c'est par l'action de la riboflavine photo-excitée que la vitamine C se dégrade rapidement et engendre la formation de  $H_2O_2$  et de sous-produits potentiellement toxiques.

Dans un premier volet *in vitro* (voir les détails dans le manuscrit), nous avons observé par la spectrométrie de masse que l'acide ascorbique se dégrade rapidement à la lumière, en présence de riboflavine, et que cette réaction est dépendante du  $H_2O_2$ , un peroxyde présent dans les solutions de MV. Ces métabolites, que nous avons identifiés sous les noms d'ions m/z 135 et m/z 207, sont soupçonnés d'interférer avec le métabolisme hépatique des lipides. Nous avons d'ailleurs discuté et proposé un modèle de réactions chimiques conduisant à leur formation. La riboflavine photo-excitée réagit avec l'ascorbate pour former un anion riboflavine radicalaire. Celui-ci réagit avec l'oxygène pour former le radical superoxyde. Le  $H_2O_2$  est formé par la dismutation de l'anion superoxyde. Nous avons proposé que le DHA, en présence de  $H_2O_2$ , se décompose en molécule de masse 208, qui lui-même se décompose en molécule de masse 136.

Avec le second volet *in vivo*, nous voulions vérifier leurs effets sur le métabolisme des lipides, après l'infusion de ces mélanges chez des cochons d'Inde nouveaux-nés. Le cochon d'Inde est un modèle animal souvent utilisé pour étudier le

métabolisme des lipides et du cholestérol en raison des nombreuses similitudes avec l'homme <sup>110</sup>. Mais c'est aussi pour ses besoins en vitamine C nutritionnelle qu'il est utilisé.

Le dessin expérimental permettait d'évaluer l'effet de la présence des ions m/z 135 et 207 formés lorsque la vitamine C et la riboflavine sont exposés ou non à la lumière. Un soin particulier a été apporté pour éliminer le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des solutions infusée aux animaux, car celui-ci pourrait avoir un effet confondant. Nous avons également regardé l'effet de la concentration en acide ascorbique et riboflavine, exposé ou non à la lumière.

Nous nous sommes principalement intéressés à la lipolyse, en mesurant l'activité de la TGH, et à la lipogénèse en mesurant l'ACC. Puisque l'ACC est régulée par phosphorylation, le dosage de son activité en présence de glutamate renseigne sur l'activité phosphatasique de la PP2A tandis que l'activité kinase a été déterminée par la mesure de l'activité de l'AMPK.

Même si au départ nous étions intéressés à l'effet de la lumière sur la formation des produits issus de la photo-dégradation de la vitamine C et l'accumulation de TG, nous nous sommes rendus compte que les concentrations en vitamines C et riboflavine pouvaient également influencer le métabolisme des lipides.

Discutons d'abord de l'effet vitamines

En effet, plus la concentration de vitamines s'élève (5%), plus les niveaux de triglycérides hépatiques et plasmatiques sont bas. Cela concorde avec une activité plus élevée de l'AMPK dans les groupes d'animaux recevant les solutions 5%. Lorsque l'AMPK est stimulée, il y a d'une part, baisse de la synthèse des acides gras et d'autre part, une augmentation de la bêta oxydation. Ceci est principalement dû à l'inactivation de l'ACC par sa phosphorylation sous l'action de l'AMPK. Cependant dans notre expérimentation, l'activité de l'ACC est demeurée inchangée et cela pour tous les groupes d'animaux. Nous avons mesuré des niveaux relativement élevés d'ACC, variant entre 3 et 5 nmoles/min/mg et qui



correspondent aux niveaux obtenus par Kowluru <sup>111</sup> dans une étude avec des cellules pancréatiques après stimulation au glutamate. La baisse des TG dans le foie pourrait davantage être expliquée par une TGH plus active, hydrolysant les TG de la « stéatose du nouveau-né ».

Cependant l'absence de corrélation entre l'AMPK et l'ACC est surprenante. L'utilisation d'un animal nouveau-né en pleine croissance, pourrait expliquer le manque d'interaction entre ces 2 enzymes. Cet animal a besoin, pour sa croissance, de métabolites structuraux comme des lipides mais aussi un grand besoin énergétique. En fait, il se pourrait que l'activité élevée de l'ACC entraîne la formation d'acides gras qui seront utilisés pour la  $\beta$ -oxydation, elle-même stimulée par l'AMPK.

Cela expliquerait la baisse des niveaux de TG plasmatiques et hépatiques observée. Cette avenue demande à être explorée de manière plus approfondie.

Ceci est intéressant car cela semble suggérer que des concentrations élevées de vitamine C peuvent entraîner une baisse de la synthèse des acides gras et du cholestérol, qu'il serait d'ailleurs intéressant de mesurer. On sait que l'AMPK activée inhibe la HMG-CoA réductase impliquée dans la synthèse du cholestérol. Des inhibiteurs de la HMG-CoA réductase sont souvent prescrits pour contrôler l'hyperlipidémie <sup>112</sup>. Des cochons d'Inde, nourrit avec des lipides oxydés et des concentrations croissantes de vitamine C, ont des niveaux plasmatiques de cholestérol plus faibles <sup>113</sup>.

Une autre explication possible de l'effet vitamines réside dans le rôle de la vitamine C sur le cycle de la carnitine.

Le cycle de la carnitine <sup>114</sup> joue un rôle essentiel dans le métabolisme des lipides, principalement dans la translocation des acides gras à travers la membrane de la mitochondrie. Une fois dans la mitochondrie, les acides gras sont oxydés pour la production d'énergie. L'une des étapes dans la synthèse de la carnitine implique une dioxygénase (dioxygénase  $\alpha$ -ketoglutarate dépendante) qui requiert du  $Fe^{2+}$  et de l'acide ascorbique <sup>115</sup>. Une déficience en vitamine C entraîne une baisse de la

synthèse de carnitine, une diminution de la translocation des acides gras dans la mitochondrie, et une accumulation de TG dans le foie.

L'activité de l'ACC et celle de l'AMPK sont également stimulées par les solutions exposées à la lumière dans le groupe des animaux qui reçoivent la solution 5%. Cela semble encore une fois contradictoire, comme si ces 2 enzymes ne se parlaient pas. On pourrait supposer que la stimulation de la PP2A surpasse l'activité de l'AMPK, ce qui favoriserait l'activation de l'ACC. Il a été démontré que le couple ascorbate/ $\text{Fe}^{2+}$ , qui génère aussi les ions m/z 135 et 207, stimule la PP2A<sup>116</sup>. On a d'ailleurs démontré une corrélation entre la concentration urinaire du métabolite m/z 207 et l'activation de l'ACC par le glutamate. Il devient essentiel de mieux démontrer, dans une étude ultérieure, l'effet de l'ion m/z 207 directement sur l'action de la PP2A.

Cependant les niveaux de TG hépatiques et plasmatiques ne sont pas affectés par l'action de la lumière.

Il faut rappeler que nous avons travaillé en dehors du contexte des multi-vitamines en isolant la vitamine C des autres molécules normalement présentes dans la solution vitaminée commerciale. Cela a peut être éliminé d'autres interactions chimiques insoupçonnées. De plus, cette étude n'est basée que sur un nombre relativement restreint d'animaux. Quatre animaux expérimentaux qui reçoivent la solution exposée à la lumière et 4 autres qui reçoivent la solution contrôle, sans lumière. Un calcul d'effectif avec un  $\beta$  de 20%, un  $\alpha$  de 5% et une différence de 40% suggère que 8 animaux seraient suffisant pour le démontrer.

D'un autre côté, la stimulation de l'ACC, via l'ajout de glutamate *in vitro*, corrèle bien avec l'augmentation des TG plasmatiques dans le groupe expérimentale. Des études chez le rat<sup>93</sup> ont également démontré une accumulation de TG associée à l'augmentation de l'activité de l'ACC et à l'inhibition de la sécrétion des acides gras.

Nous sommes donc en présence de deux phénomènes :

(1) Un effet vitamines stimulant l'activité de l'AMPK et de la TGH avec comme résultante une diminution de l'accumulation des TG et (2) un effet lumière, générant des métabolites de la vitamine C ayant un potentiel certain à modifier le métabolisme lipidique en stimulant l'AMPK et la PP2A. Ces deux enzymes ont un effet contraire sur l'activation de l'ACC. Ces observations suggèrent que l'effet lipogénique des ions  $m/z$  207-135 est plus évident avec des concentrations en vitamine C plus faibles, puisque c'est dans cette situation que nous avons observé une stimulation de l'AMPK et une légère augmentation des TG plasmatiques. D'une façon paradoxale, les ions  $m/z$  207-135 et les vitamines ont un effet similaire et additif sur l'activité de l'AMPK, indépendamment de la présence d'AMP. L'effet contraire de ces 2 paramètres peut s'expliquer par une régulation différente de l'activité de l'ACC. Les vitamines ne font que l'inhiber tandis qu'avec les molécules 208 et 136 cette inhibition peut être contrecarré par une effet positif sur la PP2A, un activateur de l'ACC. L'explication de l'effet différent sur la PP2A peut provenir du statut redox du glutathion. En fait, la PP2A est inhibée par un statut oxydant, c'est-à-dire des niveaux de GSSG élevés<sup>117</sup>.

L'infusion de la solution qui génère les molécules 136 et 208 a favorisé un environnement hépatique plus réduit, supportant par le fait même l'idée d'une stimulation de PP2A. Nous avons observé que des concentrations élevées en vitamines C entraînent une diminution des TG hépatiques et plasmatiques, une hausse du redox, ce qui corrobore bien avec l'inhibition de la PP2A, et par conséquent une meilleure inhibition de l'ACC par l'AMPK. Il semble paradoxale de spéculer qu'un environnement oxydant prévient l'accumulation de TG mais il ne faut pas oublier qu'un redox de moins de 3%, comme ceux obtenus dans cette étude, est tout de même très faible.

En conclusion, nous avons démontré que :

- L'exposition de solutions de MV à la lumière génère du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Ce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> favorise une nouvelle voie de dégradation de la vitamine C.
- Ces nouveaux métabolites issu de la photo-dégradation de la vitamine C perturbent, *in vivo*, l'activité de l'ACC ainsi que les enzymes qui la régule (AMPK et PP2A), et le métabolisme des lipides.

Les prochaines étapes devraient être :

- Une meilleure caractérisation chimique des molécules m/z 207 et 135.
- De vérifier l'effet de chacune de ces molécules sur l'activité de la PP2A.
- De mieux documenter leurs effets sur les niveaux de TG plasmatiques et hépatiques par l'utilisation d'un plus grand nombre d'animaux.

## **7- LISTE DES RÉFÉRENCES**

1. Ward, R. M. & Beachy, J. C. Neonatal complications following preterm birth. *BJOG*. **110 Suppl 20**, 8-16 (2003).
2. Saugstad, O. D. Bronchopulmonary dysplasia-oxidative stress and antioxidants. *Semin.Neonatol.* **8**, 39-49 (2003).
3. Dani, C., Cecchi, A., & Bertini, G. Role of oxidative stress as physiopathologic factor in the preterm infant. *Minerva Pediatr.* **56**, 381-394 (2004).
4. Lavoie, J. C., Belanger, S., Spalinger, M., & Chessex, P. Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition: the major contributor to in vitro generation of peroxides. *Pediatrics* **99**, E6 (1997).
5. Lavoie, J. C., Rouleau, T., & Chessex, P. Interaction between ascorbate and light-exposed riboflavin induces lung remodeling. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **311**, 634-639 (2004).
6. Chessex, P. *et al.* Photooxidation of parenteral multivitamins induces hepatic steatosis in a neonatal guinea pig model of intravenous nutrition. *Pediatr.Res.* **52**, 958-963 (2002).
7. Yu, V. Y. Principles and practice of parenteral nutrition in the neonatal period. *Acta Med.Port.* **10**, 185-196 (1997).
8. Stipek, S., Mechurova, A., Crkovska, J., Zima, T., & Platenik, J. Lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in umbilical and maternal blood. *Biochem.Mol.Biol.Int.* **35**, 705-711 (1995).
9. Postuma, R. & Trevenen, C. L. Liver disease in infants receiving total parenteral nutrition. *Pediatrics* **63**, 110-115 (1979).
10. Clarke, P. J., Ball, M. J., & Kettlewell, M. G. Liver function tests in patients receiving parenteral nutrition. *JPEN J.Parenter.Enteral Nutr.* **15**, 54-59 (1991).
11. Weinberger, B. *et al.* Association of lipid peroxidation with hepatocellular injury in preterm infants. *Crit Care* **6**, 521-525 (2002).
12. Angelico, M. & Della, G. P. Review article: hepatobiliary complications associated with total parenteral nutrition. *Aliment.Pharmacol.Ther.* **14 Suppl 2**, 54-57 (2000).
13. Chou, Y. H., Yau, K. I., Hsu, H. C., & Chang, M. H. Total parenteral nutrition-associated cholestasis in infants: clinical and liver histologic studies. *Zhonghua Min Guo.Xiao.Er.Ke.Yi.Xue.Hui.Za Zhi.* **34**, 264-271 (1993).
14. Zamir, O. *et al.* Effect of enteral feeding on hepatic steatosis induced by total parenteral nutrition. *JPEN J.Parenter.Enteral Nutr.* **18**, 20-25 (1994).
15. Whalen, G. F., Shamberger, R. C., Perez-Atayde, A., & Folkman, J. A proposed cause for the hepatic dysfunction associated with parenteral nutrition. *J.Pediatr.Surg.* **25**, 622-626 (1990).
16. Bhatia, J., Moslen, M. T., Haque, A. K., McCleery, R., & Rassin, D. K. Total parenteral nutrition-associated alterations in hepatobiliary function and histology in rats: is light exposure a clue? *Pediatr.Res.* **33**, 487-492 (1993).
17. Zaman, N., Tam, Y. K., Jewell, L. D., & Coutts, R. T. Effects of light-exposed parenteral nutrition on hepatic function and lidocaine metabolism: a study using isolated rat liver perfusion. *Pediatr.Res.* **40**, 280-287 (1996).

18. Shronts, E. P. Essential nature of choline with implications for total parenteral nutrition. *J.Am.Diet.Assoc.* **97**, 639-46, (1997).
19. Lombardi, B. & Recknagel, R. O. Interference with secretion of triglycerides by the liver as a common factor in toxic liver injury with some observations on choline deficiency fatty liver. *Am.J.Pathol.* **40**, 571-586 (1962).
20. Li, S. J. *et al.* Addition of glucagon to total parenteral nutrition (TPN) prevents hepatic steatosis in rats. *Surgery* **104**, 350-357 (1988).
21. Nussbaum, M. S. & Fischer, J. E. Pathogenesis of hepatic steatosis during total parenteral nutrition. *Surg.Annu.* **23 Pt 2**, 1-11 (1991).
22. Nussbaum, M. S. *et al.* Addition of lipid to total parenteral nutrition prevents hepatic steatosis in rats by lowering the portal venous insulin/glucagon ratio. *JPEN J.Parenter.Enteral Nutr.* **16**, 106-109 (1992).
23. Nakagawa, M. *et al.* Effect of various lipid emulsions on total parenteral nutrition-induced hepatosteatosis in rats. *JPEN J.Parenter.Enteral Nutr.* **15**, 137-143 (1991).
24. Bhatia, J., Rivera, A., Jr., Moslen, M. T., Rassin, D. K., & Gourley, W. K. Hepatic function during short-term total parenteral nutrition: effect of exposure of parenteral nutrients to light. *Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol.* **78**, 321-340 (1992).
25. Boison, D. *et al.* Neonatal hepatic steatosis by disruption of the adenosine kinase gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 6985-6990 (2002).
26. Chessex, P., Laborie, S., Lavoie, J. C., & Rouleau, T. Photoprotection of solutions of parenteral nutrition decreases the infused load as well as the urinary excretion of peroxides in premature infants. *Semin.Perinatol.* **25**, 55-59 (2001).
27. Brawley, V., Bhatia, J., & Karp, W. B. Effect of sodium metabisulfite on hydrogen peroxide production in light-exposed pediatric parenteral amino acid solutions. *Am.J.Health Syst.Pharm.* **55**, 1288-1292 (1998).
28. Laborie, S., Lavoie, J. C., Pineault, M., & Chessex, P. Contribution of multivitamins, air, and light in the generation of peroxides in adult and neonatal parenteral nutrition solutions. *Ann.Pharmacother.* **34**, 440-445 (2000).
29. Laborie, S., Lavoie, J. C., & Chessex, P. Increased urinary peroxides in newborn infants receiving parenteral nutrition exposed to light. *J.Pediatr.* **136**, 628-632 (2000).
30. Laborie, S., Lavoie, J. C., & Chessex, P. Paradoxical role of ascorbic acid and riboflavin in solutions of total parenteral nutrition: implication in photoinduced peroxide generation. *Pediatr.Res.* **43**, 601-606 (1998).
31. Massey, V. The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochem.Soc.Trans.* **28**, 283-296 (2000).
32. Kim, H., Kirschenbaum, L. J., Rosenthal, I., & Riesz, P. Photosensitized formation of ascorbate radicals by riboflavin: an ESR study. *Photochem.Photobiol.* **57**, 777-784 (1993).
33. Ramu, A., Mehta, M. M., Liu, J., Turyan, I., & Aleksic, A. The riboflavin-mediated photooxidation of doxorubicin. *Cancer Chemother.Pharmacol.* **46**, 449-458 (2000).
34. Edwards, A. M. & Silva, E. Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids. *J.Photochem.Photobiol.B* **63**, 126-131 (2001).

35. Baird, L. L. Protecting TPN and lipid infusions from light: reducing hydroperoxides in NICU patients. *Neonatal Netw.* **20**, 17-22 (2001).
36. Laborie, S., Lavoie, J. C., Pineault, M., & Chessex, P. Protecting solutions of parenteral nutrition from peroxidation. *JPEN J.Parenter.Enteral Nutr.* **23**, 104-108 (1999).
37. Thannickal, V. J. & Fanburg, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **279**, L1005-L1028 (2000).
38. Crim, C. & Longmore, W. J. Sublethal hydrogen peroxide inhibits alveolar type II cell surfactant phospholipid biosynthetic enzymes. *Am.J.Physiol* **268**, L129-L135 (1995).
39. Habib, M. P. & Clements, N. C. Effects of low-dose hydrogen peroxide in the isolated perfused rat lung. *Exp.Lung Res.* **21**, 95-112 (1995).
40. Harrison, G. J., Jordan, L. R., & Willis, R. J. Deleterious effects of hydrogen peroxide on the function and ultrastructure of cardiac muscle and the coronary vasculature of perfused rat hearts. *Can.J.Cardiol.* **10**, 843-849 (1994).
41. Iwasaka, K. *et al.* Role of hydrogen peroxide in cytotoxicity induction by ascorbates and other redox compounds. *Anticancer Res.* **18**, 4333-4337 (1998).
42. Romeo, C., Eaton, S., Quant, P. A., Spitz, L., & Pierro, A. Neonatal oxidative liver metabolism: effects of hydrogen peroxide, a putative mediator of septic damage. *J.Pediatr.Surg.* **34**, 1107-1111 (1999).
43. Ennever, J. F., Carr, H. S., & Speck, W. T. Potential for genetic damage from multivitamin solutions exposed to phototherapy illumination. *Pediatr.Res.* **17**, 192-194 (1983).
44. Benzie, I. F. Evolution of dietary antioxidants. *Comp Biochem.Physiol A Mol.Integr.Physiol* **136**, 113-126 (2003).
45. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**, 1-85 (1990).
46. Wardman, P. & Candeias, L. P. Fenton chemistry: an introduction. *Radiat.Res.* **145**, 523-531 (1996).
47. Burkitt, M. J. & Gilbert, B. C. Model studies of the iron-catalysed Haber-Weiss cycle and the ascorbate-driven Fenton reaction. *Free Radic.Res.Commun.* **10**, 265-280 (1990).
48. Comporti, M. *et al.* Plasma F2-isoprostanes are elevated in newborns and inversely correlated to gestational age. *Free Radic.Biol.Med.* **37**, 724-732 (2004).
49. Tsukahara, H. *et al.* Oxidative stress in neonates: evaluation using specific biomarkers. *Life Sci.* **75**, 933-938 (2004).
50. Laborie, S., Lavoie, J. C., Rouleau, T., & Chessex, P. Multivitamin solutions for enteral supplementation: a source of peroxides. *Nutrition* **18**, 470-473 (2002).
51. Georgeson, G. D. *et al.* Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol.* **103**, 136-139 (2002).
52. Kilic, M., Turgut, M., Taskin, E., Cekmen, M., & Aygun, A. D. Nitric oxide levels and antioxidant enzyme activities in jaundices of premature infants. *Cell Biochem.Funct.* **22**, 339-342 (2004).



53. Ochoa, J. J. *et al.* Oxidative stress in erythrocytes from premature and full-term infants during their first 72 h of life. *Free Radic.Res.* **37**, 317-322 (2003).
54. Frank, L. & Sosenko, I. R. Failure of premature rabbits to increase antioxidant enzymes during hyperoxic exposure: increased susceptibility to pulmonary oxygen toxicity compared with term rabbits. *Pediatr.Res.* **29**, 292-296 (1991).
55. Baydas, G. *et al.* Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. *Arch.Med.Res.* **33**, 276-280 (2002).
56. Robles, R., Palomino, N., & Robles, A. Oxidative stress in the neonate. *Early Hum.Dev.* **65 Suppl**, S75-S81 (2001).
57. Turgut, M. *et al.* Oxidant and antioxidant levels in preterm newborns with idiopathic hyperbilirubinaemia. *J.Paediatr.Child Health* **40**, 633-637 (2004).
58. Buhimschi, I. A., Buhimschi, C. S., Pupkin, M., & Weiner, C. P. Beneficial impact of term labor: nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **189**, 181-188 (2003).
59. Lavoie, J. C. & Chessex, P. Gender and maturation affect glutathione status in human neonatal tissues. *Free Radic.Biol.Med.* **23**, 648-657 (1997).
60. Lavoie, J. C. & Chessex, P. Development of glutathione synthesis and gamma-glutamyltranspeptidase activities in tissues from newborn infants. *Free Radic.Biol.Med.* **24**, 994-1001 (1998).
61. Lavoie, J. C., Rouleau, T., Truttman, A. C., & Chessex, P. Postnatal gender-dependent maturation of cellular cysteine uptake. *Free Radic.Res.* **36**, 811-817 (2002).
62. Sokol, R. J. *et al.* Hepatic oxidant injury and glutathione depletion during total parenteral nutrition in weanling rats. *Am.J.Physiol* **270**, G691-G700 (1996).
63. Chessex, P., Lavoie, J. C., Laborie, S., & Rouleau, T. Parenteral multivitamin supplementation induces both oxidant and antioxidant responses in the liver of newborn guinea pigs. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* **32**, 316-321 (2001).
64. Matilla, B. *et al.* Effects of parenteral nutrition supplemented with glutamine or glutamine dipeptides on liver antioxidant and detoxication systems in rats. *Nutrition* **16**, 125-128 (2000).
65. Arrigoni, O. & De Tullio, M. C. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim.Biophys.Acta* **1569**, 1-9 (2002).
66. Welch, R. W. *et al.* Accumulation of vitamin C (ascorbate) and its oxidized metabolite dehydroascorbic acid occurs by separate mechanisms. *J.Biol.Chem.* **270**, 12584-12592 (1995).
67. De Tullio, M. C. & Arrigoni, O. Hopes, disillusiones and more hopes from vitamin C. *Cell Mol.Life Sci.* **61**, 209-219 (2004).
68. Buettner, G. R. & Jurkiewicz, B. A. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat.Res.* **145**, 532-541 (1996).
69. Carr, A. & Frei, B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* **13**, 1007-1024 (1999).

70. Udenfriend, S., Clark, C. T., Axelrod, J., & Brodie, B. B. Ascorbic acid in aromatic hydroxylation. I. A model system for aromatic hydroxylation. *J.Biol.Chem.* **208**, 731-739 (1954).
71. Sakagami, H., Satoh, K., Hakeda, Y., & Kumegawa, M. Apoptosis-inducing activity of vitamin C and vitamin K. *Cell Mol.Biol.* **46**, 129-143 (2000).
72. Deutsch, J. C. Ascorbic acid oxidation by hydrogen peroxide. *Anal.Biochem.* **255**, 1-7 (1998).
73. Chen, K. *et al.* Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **279**, E1406-E1412 (2000).
74. Suh, J., Zhu, B. Z., & Frei, B. Ascorbate does not act as a pro-oxidant towards lipids and proteins in human plasma exposed to redox-active transition metal ions and hydrogen peroxide. *Free Radic.Biol.Med.* **34**, 1306-1314 (2003).
75. Kang, S. A., Jang, Y. J., & Park, H. In vivo dual effects of vitamin C on paraquat-induced lung damage: dependence on released metals from the damaged tissue. *Free Radic.Res.* **28**, 93-107 (1998).
76. Song, J. H. *et al.* Rapid uptake of oxidized ascorbate induces loss of cellular glutathione and oxidative stress in liver slices. *Exp.Mol.Med.* **35**, 67-75 (2003).
77. Gutteridge, J. M., Mumby, S., Koizumi, M., & Taniguchi, N. "Free" iron in neonatal plasma activates aconitase: evidence for biologically reactive iron. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **229**, 806-809 (1996).
78. Premkumar, K. & Bowlus, C. L. Ascorbic acid does not increase the oxidative stress induced by dietary iron in C3H mice. *J.Nutr.* **134**, 435-438 (2004).
79. Lavoie, J. C. & Chessex, P. Bound iron admixture prevents the spontaneous generation of peroxides in total parenteral nutrition solutions. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* **25**, 307-311 (1997).
80. Balet, A. *et al.* Effects of multilayered bags vs ethylvinyl-acetate bags on oxidation of parenteral nutrition. *JPEN J.Parenter.Enteral Nutr.* **28**, 85-91 (2004).
81. Kearney, M. C., Allwood, M. C., Martin, H., Neal, T., & Hardy, G. The influence of amino acid source on the stability of ascorbic acid in TPN mixtures. *Nutrition* **14**, 173-178 (1998).
82. Nordfjeld, K., Pedersen, J. L., Rasmussen, M., & Gauno, J., V. Storage of mixtures for total parenteral nutrition III. Stability of vitamins in TPN mixtures. *J.Clin.Hosp.Pharm.* **9**, 293-301 (1984).
83. Deutsch, J. C. Dehydroascorbic acid. *J.Chromatogr.A* **881**, 299-307 (2000).
84. Retsky, K. L., Freeman, M. W., & Frei, B. Ascorbic acid oxidation product(s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification. Anti- rather than prooxidant activity of vitamin C in the presence of transition metal ions. *J.Biol.Chem.* **268**, 1304-1309 (1993).
85. Gibbons, E., Allwood, M. C., Neal, T., & Hardy, G. Degradation of dehydroascorbic acid in parenteral nutrition mixtures. *J.Pharm.Biomed.Anal.* **25**, 605-611 (2001).
86. Deutsch, J. C. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid interconversion without net oxidation or reduction. *Anal.Biochem.* **247**, 58-62 (1997).

87. Deutsch, J. C. Spontaneous hydrolysis and dehydration of dehydroascorbic acid in aqueous solution. *Anal.Biochem.* **260**, 223-229 (1998).
88. Simpson, G. L. & Ortwerth, B. J. The non-oxidative degradation of ascorbic acid at physiological conditions. *Biochim.Biophys.Acta* **1501**, 12-24 (2000).
89. Deutsch, J. C. Oxygen-accepting antioxidants which arise during ascorbate oxidation. *Anal.Biochem.* **265**, 238-245 (1998).
90. Lavoie, J. C., Chessex, P., Rouleau, T., Migneault, D., & Comte, B. Light-induced byproducts of vitamin C in multivitamin solutions. *Clin.Chem.* **50**, 135-140 (2004).
91. Bobek, P., Ginter, E., Ozdin, L., Poledne, R., & Potucek, J. Effect of long-term marginal vitamin C deficiency on plasma triglyceride kinetics in guinea-pigs. *Biomed.Biochim.Acta* **42**, 413-416 (1983).
92. Ekelund, M., Roth, B., Trelde, H., Ekstrom, U., & Nilsson-Ehle, P. Effects of total parenteral nutrition on lipid metabolism in rats. *JPEN J.Parenter.Enteral Nutr.* **18**, 503-509 (1994).
93. Hall, R. I. *et al.* Pathogenesis of hepatic steatosis in the parenterally fed rat. *J.Clin.Invest* **74**, 1658-1668 (1984).
94. Kudo, N., Barr, A. J., Barr, R. L., Desai, S., & Lopaschuk, G. D. High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J.Biol.Chem.* **270**, 17513-17520 (1995).
95. Munday, M. R. Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem.Soc.Trans.* **30**, 1059-1064 (2002).
96. Ruderman, N. B., Saha, A. K., & Kraegen, E. W. Minireview: malonyl CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity. *Endocrinology* **144**, 5166-5171 (2003).
97. Boone, A. N., Chan, A., Kulpa, J. E., & Brownsey, R. W. Bimodal activation of acetyl-CoA carboxylase by glutamate. *J.Biol.Chem.* **275**, 10819-10825 (2000).
98. Gaussin, V., Hue, L., Stalmans, W., & Bollen, M. Activation of hepatic acetyl-CoA carboxylase by glutamate and Mg<sup>2+</sup> is mediated by protein phosphatase-2A. *Biochem.J.* **316 ( Pt 1)**, 217-224 (1996).
99. Gaussin, V., Skarlas, P., Ching, Y. P., Hardie, D. G., & Hue, L. Distinct type-2A protein phosphatases activate HMGCoA reductase and acetyl-CoA carboxylase in liver. *FEBS Lett.* **413**, 115-118 (1997).
100. Hardie, D. G. & Pan, D. A. Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochem.Soc.Trans.* **30**, 1064-1070 (2002).
101. Carling, D. The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem.Sci.* **29**, 18-24 (2004).
102. Winder, W. W. & Hardie, D. G. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am.J.Physiol* **277**, E1-10 (1999).
103. Witters, L. A. & Kemp, B. E. Insulin activation of acetyl-CoA carboxylase accompanied by inhibition of the 5'-AMP-activated protein kinase. *J.Biol.Chem.* **267**, 2864-2867 (1992).

104. Dolinsky, V. W., Douglas, D. N., Lehner, R., & Vance, D. E. Regulation of the enzymes of hepatic microsomal triacylglycerol lipolysis and re-esterification by the glucocorticoid dexamethasone. *Biochem.J.* **378**, 967-974 (2004).
105. Serru, V. *et al.* Quantification of reduced and oxidized glutathione in whole blood samples by capillary electrophoresis. *Clin.Chem.* **47**, 1321-1324 (2001).
106. Herrera, E. & Amusquivar, E. Lipid metabolism in the fetus and the newborn. *Diabetes Metab Res.Rev.* **16**, 202-210 (2000).
107. Bohmer, T. & Havel, R. J. Genesis of fatty liver and hyperlipemia in the fetal guinea pig. *J.Lipid Res.* **16**, 454-460 (1975).
108. Ferre, P., Decaux, J. F., Issad, T., & Girard, J. Changes in energy metabolism during the suckling and weaning period in the newborn. *Reprod.Nutr.Dev.* **26**, 619-631 (1986).
109. Browning, J. D. & Horton, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J.Clin.Invest* **114**, 147-152 (2004).
110. Fernandez, M. L. Guinea pigs as models for cholesterol and lipoprotein metabolism. *J.Nutr.* **131**, 10-20 (2001).
111. Kowluru, A., Chen, H. Q., Modrick, L. M., & Stefanelli, C. Activation of acetyl-CoA carboxylase by a glutamate- and magnesium-sensitive protein phosphatase in the islet beta-cell. *Diabetes* **50**, 1580-1587 (2001).
112. Jingami, H. [HMG-CoA reductase inhibitor for therapy of patients with hyperlipoproteinemia ]. *Nippon Rinsho* **52**, 3271-3278 (1994).
113. Liu, J. F. & Lee, Y. W. Vitamin C supplementation restores the impaired vitamin E status of guinea pigs fed oxidized frying oil. *J.Nutr.* **128**, 116-122 (1998).
114. Brivet, M. *et al.* Defects in activation and transport of fatty acids. *J.Inherit.Metab Dis.* **22**, 428-441 (1999).
115. Hulse, J. D., Ellis, S. R., & Henderson, L. M. Carnitine biosynthesis. beta-Hydroxylation of trimethyllysine by an alpha-ketoglutarate-dependent mitochondrial dioxygenase. *J.Biol.Chem.* **253**, 1654-1659 (1978).
116. Yu, J. S. Activation of protein phosphatase 2A by the Fe<sup>2+</sup>/ascorbate system. *J.Biochem.(Tokyo)* **124**, 225-230 (1998).
117. Rao, R. K. & Clayton, L. W. Regulation of protein phosphatase 2A by hydrogen peroxide and glutathionylation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **293**, 610-616 (2002).