

Université de Montréal

**L'impact d'une diète néonatale déficiente en nutriments
essentiels à la défense antioxydante sur le métabolisme énergétique à long terme**

Par

Valérie Turcot

Département de nutrition

Faculté de médecine

Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M.Sc.) en nutrition

Août, 2008

© **Valérie Turcot, 2008**

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**L'impact d'une diète néonatale déficiente en nutriments
essentiels à la défense antioxydante sur le métabolisme énergétique à long terme**

présenté par :

Valérie Turcot

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Anne-Monique Nuyt
président rapporteur

Dr Jean-Claude Lavoie
directeur de recherche

Dre Jane Montgomery
membre du jury

RÉSUMÉ

Les prématurés subissent un stress oxydant qui résulte d'une défense antioxydante faible et/ou d'une charge oxydante. Des données suggèrent qu'un stress oxydant peut affecter le métabolisme énergétique et mener au syndrome métabolique.

Hypothèse: Une faible défense antioxydante tôt dans la vie est suffisante pour affecter le métabolisme énergétique à long terme.

Méthodes: Quatre groupes de cobayes (n=21) ont reçu entre leurs 3^e et 7^e jours de vie une diète standard (C-1sem, C-14sem) ou une diète déficiente (DC-1sem, DC-14sem). À 7 jours, les groupes C-1sem et DC-1sem ont été sacrifiés, le plasma et le foie collectés. Les groupes C-14sem et DC-14sem ont reçu la diète standard jusqu'à 14sem de vie. La glycémie et les triglycérides plasmatiques ont été mesurés à 1, 3, 11, et 13-14sem. La tolérance au glucose a été évaluée à 13sem. Les antioxydants hépatiques et les protéines régulant le métabolisme énergétique ont été analysés à 1 et 14sem.

Résultats: Un statut redox oxydé du glutathion était associé avec la diète déficiente et était maintenu oxydé au moins jusqu'à 14sem (p<0.01). Les faibles niveaux de triglycérides plasmatiques et de glycémies, ainsi qu'une meilleure tolérance au glucose à 14sem (p<0.05) étaient associés avec un statut redox plus oxydé.

Conclusion: Le faible taux de glutathion observé chez les prématurés a été reproduit dans notre modèle. Puisque nos données suggèrent un rôle protecteur d'un redox plus oxydé et que l'environnement redox est un important régulateur métabolique influençant le développement, il faudrait faire attention avant d'initier des traitements antioxydants agressifs chez les prématurés.

MOTS-CLÉS

Cobaye, défense antioxydante, foie, glycémie, métabolisme énergétique, nutrition néonatale, redox du glutathion, stress oxydant néonatal, syndrome métabolique, triglycéridémie

ABSTRACT

Preterm infants are faced to oxidative stress resulting from a low antioxidant defence and/or a high oxidant load. Datas suggest that an oxidative stress may impair energy metabolism leading to metabolic syndrome development.

Hypothesis: A weak antioxidant defence early in life such as observed in preterm newborns is sufficient to impair energy metabolism later in life.

Methods: Four groups of guinea pigs (n=21) received between their 3rd and 7th days of life a control diet (C-1week, C-14weeks) or antioxidant deficient diet (DC-1week, DC-14weeks). At 7 day-old, 1week-groups were sacrificed for plasma and liver sampling whereas 14week-groups were fed with the control diet until 14 week-old. Blood glucose and plasma triacylglycerol were determined at 1, 3, 11 and 13-14 week-old. Glucose tolerance test was performed at 13 week-old. Hepatic antioxidant defences and key proteins regulating lipid and glucose metabolism were measured at 1 and 14 weeks.

Results: The oxidized redox status of glutathione associated with the neonatal deficient diet was maintained until at least 14 week-old ($p < 0.01$). The low plasma triacylglycerol, low blood glucose and better tolerance to glucose at 14 weeks ($p < 0.05$) were associated with an oxidized redox status.

Conclusion: The low glutathione observed in newborn preterm infants has been reproduced in our animal model. Since the oxidized redox state observed here seems to be protective against impaired energy metabolism and since the cellular redox environment is known to be an important rheostat of metabolism influencing development, it suggests being careful before adopting aggressive antioxidant treatments in preterm infants.

KEYWORDS

Antioxidant defence, blood glucose, energetic metabolism, guinea pig, liver, metabolic syndrome, neonatal nutrition, neonatal oxidative stress, plasma triacylglycerol, redox of glutathione

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
REMERCIEMENTS.....	xi
1. Introduction.....	1
2. La balance entre oxydants et antioxydants.....	4
2.1. Les principaux oxydants et leurs effets.....	4
2.2. Les principaux antioxydants et leurs fonctions.....	5
2.2.1. Superoxyde dismutase.....	5
2.2.1. Le système du glutathion.....	7
2.2.3. Catalase.....	8
2.2.4. Antioxydants exogènes : vitamines C et E, β -carotène.....	8
2.3. Les causes et conséquences générales d'un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants.....	10
3. Les nutriments essentiels à la défense antioxydante.....	12
3.1. Méthionine et cystéine : pour le glutathion.....	12
3.1.1. Métabolisme et fonctions.....	12
3.1.2. Effets d'une déficience.....	15
3.2. Sélénium : pour la glutathion peroxydase.....	15
3.2.1. Métabolisme et fonctions.....	15
3.2.2. Effets d'une déficience.....	16
3.3. Riboflavine : pour la glutathion réductase.....	17
3.3.1. Métabolisme et fonctions.....	17
3.3.2. Effets d'une déficience.....	18
3.4. Cuivre, zinc et manganèse : pour les superoxydes dismutases.....	18
3.4.1. Métabolisme et fonctions.....	18
3.4.2. Effets d'une déficience.....	19
3.5. Fer : pour la catalase.....	20
3.5.1. Métabolisme et fonctions.....	20
3.5.2. Effets d'une déficience.....	21

3.6. Antioxydants exogènes : vitamines C et E, β -carotène.....	21
3.6.1. Métabolisme et fonctions.....	21
3.6.2. Effets d'une déficience	22
4. Le métabolisme de l'énergie hépatique.....	24
4.1. Mécanismes régulateurs	24
4.1. La voie de la glycolyse au niveau hépatique	25
4.1.1. L'entrée du glucose sanguin dans les hépatocytes et formation du pyruvate.....	26
4.1.2. Conversion du pyruvate en acétyl-CoA.....	27
4.1.3. Le hypoxia inducible factor-1 α : activateur de la glycolyse et modulé par un stress oxydant.....	27
4.2. La voie de la lipogenèse	28
4.2.1. L'acétyl-CoA carboxylase: enzyme régulatrice de la lipogenèse.....	28
4.2.2. La protéine activée par l'AMP: enzyme régulant l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase	30
4.2.3. Les triglycérides hépatiques : point d'arrivée de la lipogenèse.....	31
4.2.4. Les triglycérides plasmatiques en fonction des triglycérides hépatiques	32
5. La théorie de la programmation	33
7. Hypothèse et objectif de l'étude.....	36
8. Méthodologie	37
8.1. Préliminaires à l'étude.....	37
8.2. Méthodes présentées dans l'article.....	39
8.3. Détails des méthodes abrégées de l'article.....	40
8.4. Autres méthodes non insérées dans l'article	43
9. Article soumis au journal scientifique <i>Diabetes</i>	45
10. Autres résultats.....	74
11. Discussion globale	77
12. Conclusion	87
LES SOURCES DOCUMENTAIRES	88
ANNEXE I.....	xi
ANNEXE II.....	xiv

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Relevé des apports nutritionnels moyens en énergie, macronutriments et méthionine durant la 1 ^{re} semaine de vie	73
------------------	--	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Aperçu du système de défenses antioxydantes	6
Figure 2	Liens entre les métabolismes de la méthionine, cystéine et folate	14
Figure 3	Résumé du métabolisme énergétique hépatique	25
Figure 4	Concentrations de pyruvate hépatique et corrélation avec le HIF-1 α	74

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α	alpha
ACC	acétyl-coA carboxylase
Acétyl-CoA	acétyl-coenzyme A
ADN	acide désoxyribonucléique
AMP	adénosine monophosphate
AMPK	protéine kinase activée par l'AMP
ANOVA	analyse de variance
AQR	apports quotidiens recommandés
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
β	bêta
ChREBP	<i>carbohydrate response element binding protein</i>
Cu	cuiivre
CuZn-SOD	superoxyde dismutase avec cuivre et zinc
°C	degré Celsius
δ	delta
Dr(e)	docteur(e)
EC-SOD	superoxyde dismutase extracellulaire
FAD	flavine adénine dinucléotide
FMN	flavine mononucléotide
Fe²⁺	fer ferreux
Fe³⁺	fer ferrique
(x) g	force gravitationnelle
g	gramme
γ	gamma
GLUT	transporteur du glucose
GSH	glutathion réduit
GSSG	forme disulfure du glutathion oxydé
GSH-Px	glutathion peroxydase
GSSG-R	glutathion réductase

HIF-1α	<i>hypoxia inducible factor-1α</i>
H₂O	eau
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène
kg	kilogramme
K_m	constante de Michaelis
L	litre
Malonyl-CoA	malonyl-coenzyme A
m	milli
μ	micro
M	molaire (millimole/litre)
min	minute
Mn-SOD	superoxyde dismutase avec manganèse
NADPH/NADP⁺	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite
NADP⁺	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée
nm	nanomètre
\bulletNO	oxyde nitrique
NP	nutrition parentérale
O₂	oxygène
O₂\bullet^-	superoxyde
OH\bullet	radical hydroxyle
ONOO$^-$	peroxynitrite
p	pico
PP2A	protéine phosphatase de type 2A
PTP-1B	protéine phosphatase-1B
RNS	espèces réactives à l'azote
ROS	espèces réactives à l'oxygène
SAM	S-adénylméthionine
s.e.m	erreur type à la moyenne
SOD	superoxyde dismutase
SREBP-1c	<i>sterol regulatory element binding protein-1c</i>
TG	triglycérides
v	volume

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier les Instituts de Recherche en Santé du Canada ainsi que la Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal pour leurs financements à ma bourse de maîtrise, ainsi que le département de nutrition de l'Université de Montréal pour les bourses obtenues relatives à mon projet de maîtrise, aux présentations dans des congrès et à la rédaction du mémoire. Je remercie le Dr Jean-Claude Lavoie de m'avoir conseillée et dirigée au cours de mon projet de maîtrise, ainsi que de m'avoir transmis la passion de la recherche. Je remercie aussi l'assistante de recherche du laboratoire, Thérèse Rouleau, pour son aide et ses conseils concernant les techniques de laboratoire et les connaissances en biochimie. Finalement, j'aimerais remercier mon conjoint pour son appui, son écoute et ses multiples encouragements qui m'ont aidée à persévérer et à vouloir poursuivre dans le domaine de la recherche en nutrition.

1. Introduction

L'équilibre entre les molécules oxydantes et les défenses antioxydantes de l'organisme est essentiel au bon fonctionnement de la cellule. Dans certaines conditions, il arrive que l'organisme ne parvienne pas à éliminer adéquatement la présence de molécules oxydatives et entraîne ainsi le développement d'un état oxydé. Tel est le cas chez les prématurés où les défenses antioxydantes sont faibles (1-6) et où la charge oxydative est considérablement augmentée via l'oxygène supplémentaire administré et l'infusion d'une nutrition parentérale (7) contaminée par des peroxydes (8). On observe chez ces prématurés des niveaux de glutathion grandement abaissés (1, 3). Ceux-ci sont à risque de développer des complications pulmonaires (9, 10), rétinienne (11), cognitives (12, 13), et métaboliques (14-16) qui ont toutes été liées à l'importance du stress oxydant néonatal à long terme. Il s'avère donc essentiel de contrer ce stress oxydant néonatal, soit en diminuant la formation de peroxydes dans la NP (abaisser la charge oxydative) ou en répondant adéquatement aux besoins nutritionnels de ceux-ci (augmenter les défenses antioxydantes).

Actuellement, il est démontré qu'il existe un stress oxydant en présence d'obésité (17), sans toutefois connaître si le stress oxydant en est la cause ou la conséquence. Par contre, le stress oxydant serait impliqué dans le développement du diabète et de l'athérosclérose (18, 19). Le lien existant entre la présence d'un stress oxydant en période néonatale et le développement de complications métaboliques à long terme est complexe et encore peu défini, notamment en ce qui concerne le développement du syndrome métabolique dont la prévalence augmente dans la population pédiatrique (20, 20a, 20b). Elle est actuellement autour de 10 % chez les enfants et les adolescents du Québec (20). Autres que des facteurs génétiques et de modes de vie, il serait pertinent de déterminer le rôle que pourrait jouer un stress oxydant néonatal sur les probabilités de souffrir d'obésité abdominale, d'hypertension, d'hyperglycémie à jeun, d'hypertriglycéridémie, et/ou d'avoir des niveaux de HDL cholestérol abaissés (lipoprotéines de haute densité), dont la présence de trois de ces facteurs représente un syndrome métabolique.

Jusqu'à tout récemment, il s'est avéré que l'infusion d'une NP néonatale exposée à la lumière entraîne une hausse des triglycérides (TG) plasmatiques chez des cobayes de 1 semaine de vie (21) ainsi que chez les prématurés (16), comparativement à ceux ayant reçu

une NP bien protégée de la lumière. De plus, il a été noté chez ces mêmes cobayes que l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC : impliquée dans la lipogenèse) était plus élevée (21) et qu'une stéatose hépatique était présente (15). Ainsi, l'infusion de peroxydes via la NP semblerait activer la voie de la lipogenèse chez l'animal.

Sachant que l'augmentation des molécules oxydantes dans l'organisme entraîne une hausse du stress oxydant, deux conséquences peuvent survenir :

- 1) ce stress oxydant peut venir stabiliser le *Hypoxia Inducible factor-1 α* (HIF-1 α) (18, 19, 22, 23), ce qui favoriserait davantage la formation de pyruvate et d'acétyl-CoA en plus de l'acétyl-CoA déjà obtenu via la β -oxydation des acides gras. Il y aurait donc plus d'adénosine triphosphate (ATP) formé via l'introduction de l'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs, suivi d'une baisse du ratio adénosine monophosphate (AMP)/ATP, d'une diminution de la phosphorylation de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) qui entraînerait une baisse de son inhibition au niveau de l'ACC et alors le maintien de l'activité de l'ACC au niveau de la lipogenèse. Le tout créerait une hausse de la formation de TG hépatiques pouvant être ensuite véhiculés dans les lipoprotéines plasmatiques.
- 2) ce stress oxydant augmenterait les besoins de synthèse du glutathion, stimulerait l'utilisation de la méthionine pour former la cystéine et ainsi diminuerait les niveaux de S-adénosylméthionine (SAM) nécessaire au processus de méthylation des gènes et des histones (24). Ces méthylations semblent critiques en période de développement (foetal et néonatal) et resteraient de façon permanente à long terme (25, 26). Ainsi, un phénomène épigénétique pourrait être impliqué dans l'expression de certaines enzymes ou protéines du métabolisme de l'énergie durant la période néonatale et les effets perdureraient dans le temps.

L'hypothèse globale est qu'une rupture de l'équilibre entre les molécules oxydantes et la défense antioxydante perturbe le métabolisme de l'énergie en période néonatale et que ces complications sont maintenues dans le temps par des phénomènes épigénétiques.

Cette hypothèse est présentement étudiée, au laboratoire de Dr Lavoie, avec le modèle de cobayes nouveau-nés recevant une charge oxydative via la NP exposée à la lumière.

Il restait encore à connaître le rôle que pourrait jouer une défense antioxydante néonatale faible, telle qu'observée chez les prématurés, dans le développement des complications métaboliques. Ainsi, mon projet de maîtrise était de valider cette hypothèse avec un modèle de cobayes nouveau-nés où l'on souhaitait perturber la défense antioxydante à l'aide d'une diète restreinte en nutriments essentiels au maintien de cette défense. Le métabolisme de l'énergie hépatique a été étudié à court et à long terme, tandis que les possibilités de phénomènes épigénétiques seront discutées.

Les prochaines sections feront une révision des composantes de la balance entre oxydants et antioxydants, des nutriments essentiels à la défense antioxydante, du métabolisme de l'énergie hépatique au niveau de la glycolyse et de la lipogenèse, de la théorie de la programmation et de l'épigénétique, ainsi qu'une introduction aux rôles possibles du stress oxydant néonatal dans les complications métaboliques à long terme. Il y aura ensuite la présentation du plan expérimental du projet, des méthodes utilisées, ainsi que des résultats obtenus. Cette dernière section sera présentée en majeure partie sous forme d'un article scientifique qui sera prochainement soumis dans le journal *Diabetes*. Une discussion globale fera ensuite état de la validation ou non de l'hypothèse de départ, ainsi que l'analyse des résultats obtenus par l'entremise d'un regard critique de l'état des connaissances actuelles de la littérature et à la qualité de la méthodologie utilisée. Le tout se terminera par des pistes de solutions aux études futures et conclura sur le principal message à retenir de cette étude.

2. La balance entre oxydants et antioxydants

2.1. Les principaux oxydants et leurs effets

Les molécules oxydantes peuvent provenir de différentes sources notamment des radicaux libres dérivés de l'oxygène (ERO: espèces réactives à l'oxygène ou *ROS* : *reactive oxygen species*) et ceux dérivés de l'azote (ERN: espèces réactives à l'azote ou *RNS* : *reactive nitrogen species*). Ces radicaux libres ont la caractéristique d'avoir un électron célibataire sur leur orbital externe, ce qui leur confère une grande instabilité et ils chercheront à arracher un électron d'une autre molécule pour se stabiliser. Ce qui peut ainsi endommager les lipides, les protéines et l'acide désoxyribonucléotide (ADN) cellulaires et affecter leurs fonctions. D'un autre côté, ils sont aussi nécessaires dans la prévention de certaines maladies en assistant aux défenses du système immunitaire, en influençant certaines voies de signalisation cellulaire ainsi que le contrôle de la croissance, de la prolifération et de l'apoptose cellulaire (27).

Les ROS sont constamment produits de façon endogène via des processus physiologiques aérobiques. Le superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est le premier ROS formé lors de la respiration cellulaire (chaîne de transport d'électrons) et par diverses enzymes oxydases (NADPH et xanthine oxydases). Celui-ci n'est pas très réactif, mais il peut se combiner à l'oxyde nitrique ($^{\bullet}NO$), nécessaire à la vasodilatation et l'agrégation plaquettaire, pour former un puissant RNS soit le peroxyde nitrite ($ONOO^-$). Ce dernier peut attaquer les membranes lipidiques, l'ADN et les cystéines, méthionines et tyrosines de diverses protéines, entraînant ainsi des dommages aux cellules endothéliales (17, 28, 29). En temps normal, le $O_2^{\bullet-}$ est rapidement converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) au niveau cytosolique et mitochondrial limitant ainsi la formation de $ONOO^-$ (28, 29).

Le H_2O_2 provient à la fois du $O_2^{\bullet-}$ ou bien directement via les peroxysomes lors de l'oxydation des acides gras et de divers métabolites cellulaires (28). Bien qu'il soit non radicalaire tel que les ROS, le H_2O_2 peut diffuser et traverser les membranes cellulaires facilement (28). Non seulement il exerce les mêmes effets que les ROS, le H_2O_2 peut aussi dépléter l'ATP, le glutathion, ainsi que le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) cellulaire (30). En présence de fer ferreux (Fe^{2+}) et de cuivre (Cu^{2+}), le H_2O_2

peut former le radical hydroxyle (OH^\bullet) via la réaction de Fenton (31). Le OH^\bullet est un ROS qui est très réactif, tout comme le ONOO^- , et il attaque rapidement n'importe quelles macromolécules présentes à sa proximité (31).

D'autres molécules oxydantes existent hormis les radicaux libres et le H_2O_2 , notamment les macromolécules ayant été attaquées par les oxydants préalablement cités, ainsi que leurs produits de dégradation. Parmi ceux-ci, on retrouve ceux provenant de la peroxydation lipidique, soient le malondialdéhyde, les hydroperoxydes lipidiques, les diènes conjugués, le 4-hydroxynonéal (32) et les isoprostanes, ainsi que ceux provenant des dommages causés aux protéines (groupements carbonyles, produits de glycation avancée) et à l'ADN (8-hydroxy-2'-déoxyguanosine). Les lipides et les protéines oxydés peuvent être cytotoxiques et entraîner une dysfonction des récepteurs membranaires, des voies de signalisation et des fonctions intracellulaires pouvant mener à la mort cellulaire suite aux dommages engendrés à l'ADN (33).

2.2. Les principaux antioxydants et leurs fonctions

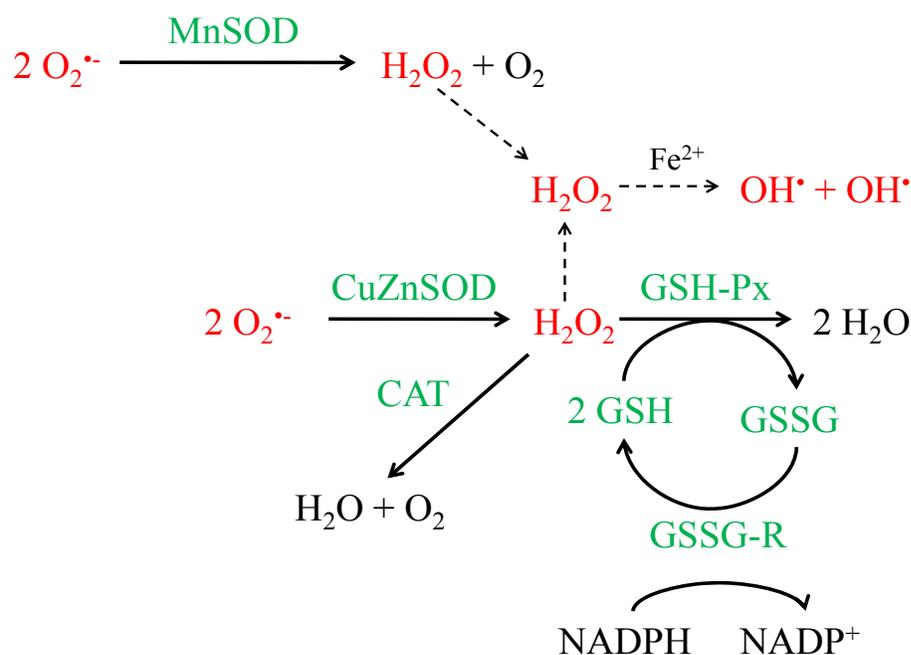
Afin de contrôler les niveaux d'oxydants cellulaires, divers antioxydants enzymatiques et non enzymatiques existent. Ceux-ci aident à neutraliser les radicaux libres et les divers peroxydes, modulant ainsi les effets de ces oxydants sur les fonctions cellulaires et la peroxydation des macromolécules. Les antioxydants enzymatiques et les thiols, tels que le glutathion, se retrouvent dans divers tissus, principalement au niveau du foie, sang, cerveau, et muscle (33). La **figure 1** présente un survol des joueurs clés de la défense antioxydante qui seront discutés dans ce mémoire.

2.2.1. Superoxyde dismutase

C'est l'enzyme permettant de dismuter plus facilement deux ions $\text{O}_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 et ainsi prévenir la formation de ONOO^- suite à la combinaison de $\text{O}_2^{\bullet-}$ avec le $\bullet\text{NO}$. Il existe trois formes de superoxyde dismutase (SOD), soient la forme mitochondriale nécessitant le manganèse comme cofacteur (Mn-SOD), ainsi que la forme cytosolique (CuZn-SOD) et extracellulaire (EC-SOD) nécessitant le cuivre et le zinc comme cofacteurs. C'est toutefois le cuivre qui participe à la réaction d'oxydoréduction pour la CuZn-SOD et EC-SOD. Chez

l'humain, la EC-SOD est davantage exprimée dans le cœur, le placenta, le pancréas et les poumons, suivi des reins, du muscle squelettique et du foie (34). Les deux autres SOD seraient exprimées dans la plupart des tissus. La Mn-SOD serait très importante physiologiquement puisqu'elle est la première ligne de défense contre le stress oxydant ($O_2^{\bullet-}$ mitochondriale). Les souris qui en sont déficientes meurent quelques jours après la naissance en présence d'une dilatation du myocarde et d'une accumulation de lipides dans le foie et le muscle squelettique et ce, suite à une possible inhibition de l'aconitase (impliquée dans le cycle de Krebs) par le $O_2^{\bullet-}$ (35). De plus, la Mn-SOD serait grandement impliquée dans le rhéostat du potentiel redox de la cellule en influençant les concentrations de $O_2^{\bullet-}$ et de H_2O_2 cellulaires (36). Elle serait davantage exprimée lors d'un stress oxydant, mais son activité serait affectée par la présence de $ONOO^{\bullet}$ (37).

Figure 1 : Aperçu du système de défenses antioxydantes



Légende: CAT: catalase; Fe^{2+} : fer ferreux; GSH: glutathion réduit; GSSG: glutathion oxydé disulfure; GSH-Px: glutathion peroxydase; GSSG-R: glutathion réductase; H_2O : eau; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène; NADPH/ $NADP^+$: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite/oxydée; O_2 : oxygène; $O_2^{\bullet-}$: superoxyde; OH^{\bullet} : radical hydroxyle; SOD: superoxyde dismutase.

2.2.1. Le système du glutathion

Le glutathion (GSH) est un antioxydant non enzymatique synthétisé à partir de la cystéine, du glutamate et de la glycine et nécessite de l'ATP (38). Elle se fait en deux étapes où la première est l'étape limitante catalysée par la γ -glutamylcystéine synthétase. Le GSH exerce une rétro-inhibition sur la γ -glutamylcystéine synthétase (39) et l'activité de cette dernière va aussi dépendre de la disponibilité de la cystéine (38). La deuxième étape de la synthèse du GSH est catalysée par la GSH synthétase et n'est pas rétro-inhibée par le GSH. Le taux de synthèse hépatique en GSH dépend du taux de GSH exporté via divers systèmes de transport, soit dans le plasma, la bile et la mitochondrie (40). Il s'est avéré, sur des hépatocytes de rat cultivés *in vitro*, que l'expression de la γ -glutamylcystéine synthétase peut être augmentée en présence d'un stress oxydant induit par le DEM (maléate de diéthyle; se conjugue au GSH) et le TBH (tert-butylhydroperoxyde; favorise la formation de GSSG par la GSH-Px) (41) et ainsi permettrait d'augmenter la synthèse de GSH.

On peut retrouver le glutathion sous deux formes, soit la forme thiol-réduite (GSH) ou bien sous la forme oxydée où une molécule de GSH peut se fixer à un thiol d'une autre molécule (R-SSG) ou d'un autre GSH (GSSG). Cette dernière forme oxydée se retrouve sous forme disulfure suite à la réduction du H_2O_2 et d'autres peroxydes en eau (ROOH ou $\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{GSH} \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$) et ce, aux niveaux cytosolique et mitochondrial (38, 42, 43).

La glutathion peroxydase (GSH-Px), une sélénoprotéine, catalyse cette dernière réaction qui s'effectue en diverses étapes : 1) le sélénate actif (Se^-) du GSH-Px devient oxydé en acide sélénique (SeOH) par le peroxyde, 2) il forme ensuite un adduit avec un GSH (SeSG) et 3) revient sous sa forme d'origine en ajoutant un second GSH pour former le GSSG (44). Le GSSG peut être réduit en GSH via la glutathion réductase (GSSG-R), une flavoprotéine, et ce, à l'aide du NADPH comme cofacteur : 1) la flavine (sous forme de flavine adénine dinucléotide; FAD) de l'enzyme est réduite par deux électrons provenant du NADPH, ce qui permet de réduire l'enzyme au niveau de son disulfure juxtaposé au FAD et de transférer ceux-ci à une molécule de GSSG afin de la réduire en deux molécules de GSH (45). Ainsi, le système de glutathion permet de maintenir les réserves de GSH à des niveaux normaux afin qu'il puisse exercer pleinement ses fonctions (**figure 1**) (38).

En période de stress oxydant, où divers peroxydes peuvent être formés, les concentrations de GSSG augmentent et créent une hausse du statut redox de la cellule (statut plus oxydé) (46). Cette condition a elle-même des conséquences puisque le GSSG peut se lier avec des groupements thiols de diverses protéines (protéine-SSG; glutathionylation) et modifier leur activité (38, 46). Il est aussi possible d'exporter le GSSG vers le milieu extracellulaire afin de rétablir le statut redox de la cellule, et ce, seulement si la cellule parvient à synthétiser du GSH afin de pallier la baisse des réserves en glutathion total (GSH et GSSG) (38). Toutefois, il semblerait que la glutathionylation avec le GSSG arrive peu dans les conditions *in vivo* puisque les niveaux de GSSG doivent être plus élevés que dans les conditions physiologiques (43). En contrepartie, la glutathionylation des protéines survient davantage à la suite de l'atteinte des thiols des protéines par des ROS/RNS et qui nécessiteront ensuite le GSH pour les glutathionyler. La glutathionylation est réversible en présence de GSH et elle est catalysée principalement par la glutaredoxin (protéine-SSG + GSH → protéine-SH + GSSG), ce qui rétablit les fonctions normales de la protéine (38, 43, 47).

Le GSH possède plusieurs autres fonctions, dont la détoxification des xénobiotiques et de leurs métabolites via la glutathion S-transférase. Il est aussi utile pour stocker la cystéine au foie et d'être relâché dans la circulation, et ce, afin de fournir la cystéine aux autres tissus via la γ -glutamyltransférase (libère la cystéine du GSH) qui est située à la membrane externe des cellules (38, 48).

2.2.3. *Catalase*

Cette enzyme permet de transformer le H₂O₂ en eau et oxygène (H₂O₂ → 2 H₂O + O₂). La catalase possède des groupements hèmes où le fer permet de catalyser la réaction. Tout comme le système du glutathion, la catalase prévient l'accumulation de H₂O₂ pour former le OH[•]. Cette enzyme est surtout présente dans les peroxyosomes, là où le H₂O₂ est formé en grande quantité lors de l'oxydation des acides gras.

2.2.4. *Antioxydants exogènes : vitamines C et E, β -carotène*

Une bonne partie des antioxydants non enzymatiques sont obtenus par les aliments (exogènes), notamment par la consommation de fruits et de légumes de même qu'en

suppléments nutritionnels. Ils permettent de renforcer les défenses antioxydantes endogènes (glutathion et enzymes). Les plus importants d'entre eux seront abordés ci-dessous ainsi que dans le chapitre 3 discutant des nutriments essentiels à la défense antioxydante.

La vitamine C est un antioxydant hydrosoluble qui réduit les superoxydes (O_2^{\bullet}), les radicaux hydroxyles ($\bullet OH$) et les peroxydes (ROO^{\bullet}). Elle devient donc oxydée à son tour et est ensuite réduite par le système du glutathion. Elle se retrouve en grande concentration dans le foie, le cerveau, la rate, le pancréas et les glandes hypophysaires et surrénales (33).

La vitamine E est un puissant antioxydant liposoluble et, bien qu'elle existe sous diverses formes dans les aliments (α -, β -, γ -, δ -tocophérols et -tocotriénols), c'est la forme α -tocophérol qui est la plus répandue *in vivo* puisque la protéine de transfert du tocophérol (α -TTP) hépatique, permettant de véhiculer le tocophérol vers le plasma, a plus d'affinité avec l' α -tocophérol qu'avec les autres formes de vitamine E (49). Cette vitamine réduit les radicaux peroxydes et hydroxyles en leur livrant un électron, ce qui permet d'empêcher et d'arrêter le processus de peroxydation des lipides et d'autres molécules. La vitamine E devient donc oxydée et sera réduite à l'aide de la vitamine C afin de retrouver son pouvoir antioxydant. Elle se retrouve dans les lipoprotéines, les membranes cellulaires et les fluides extracorporels (33).

Les carotènes sont la seule forme de vitamine A possédant un pouvoir antioxydant et d'origine végétale seulement. Ils sont liposolubles et se retrouvent dans les membranes cellulaires des tissus et les lipoprotéines (50). La forme la plus connue est le β -carotène, sans parler des autres de plus en plus étudiées : lycopène, lutéine et zéaxanthine. Le β -carotène réagit davantage avec l'oxygène singulet (1O_2 : oxygène excité), un autre type de ROS, ainsi que les radicaux peroxydes (50).

Évidemment, bien d'autres antioxydants se retrouvent dans les aliments, notamment les polyphénols et les diverses formes de caroténoïdes, mais ceux-ci ne seront pas abordés dans ce mémoire.

2.3. Les causes et conséquences générales d'un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants

Un déséquilibre entre la vitesse de production de radicaux libres et la vitesse des antioxydants à les éliminer entraîne la présence d'un état de stress oxydant. Si ce déséquilibre est trop important, les niveaux de radicaux libres seront tels que les fonctions cellulaires peuvent en être affectées comme il a été discuté précédemment. Divers facteurs peuvent engendrer la présence et la sévérité d'un stress oxydant, que ce soit de sources endogènes (exercice physique très intense, stress psychologique, maladies inflammatoires, cancer, ischémie, apoptose) ou exogènes (alimentation, polluants, médicaments, radiations) (19).

Il est actuellement connu que plusieurs complications métaboliques sont associées avec un stress oxydant, telles que l'obésité, le diabète et l'athérosclérose (17, 18, 51). Dans ce cas, il est inquiétant de savoir que les prématurés sont grandement susceptibles de subir un stress oxydant important caractérisé par des niveaux de glutathion très abaissés (1, 3). Ceux-ci reçoivent une NP qui est administrée par la circulation veineuse puisqu'ils ne peuvent pas recevoir une alimentation entérale complète. Les solutions utilisées pour cette NP ont grandement évolué afin de satisfaire les besoins nutritionnels des prématurés. Malheureusement, les niveaux de glutathion des prématurés restent bas malgré la présence d'acides aminés et de vitamines antioxydantes fournis par la NP (1).

Cette condition peut être expliquée par deux éléments. D'abord une charge oxydative importante via l'oxygénation mécanique, ainsi qu'une contamination des solutions de NP néonatale par des peroxydes lorsqu'elles sont en présence d'oxygène et de lumière (8, 52). De l'autre côté, les prématurés ont des défenses antioxydantes immatures ou affaiblies caractérisées par : 1) une activité plus faible en CuZn-SOD, GSH-Px et en catalase (2), 2) des concentrations sanguines plus faibles en vitamines E et C (5, 6), une baisse de la capacité d'incorporation de la cystéine au niveau cellulaire (nécessaire à la synthèse du GSH) (4), ainsi que des niveaux de glutathion total (GSH + GSSG) plus faibles à la naissance (3).

Il est bien connu que les prématurés recevant une NP sont enclins au développement de stéatose et cholestase hépatique (53). Comme discuté en introduction, les peroxydes de la NP sont associés à une hausse des TG plasmatiques chez l'enfant prématuré (16), de même que chez le cobaye nouveau-né (54). Avec ce modèle animal, on observe la présence d'une stéatose hépatique (15) qui pourrait être expliquée par une stimulation de la voie de la lipogenèse (21, 54). Dans ce contexte-ci, un stress oxydant néonatal semble être lié à des complications métaboliques.

3. Les nutriments essentiels à la défense antioxydante

Afin d'isoler le rôle que pourrait jouer une déficience dans la défense antioxydante sur le développement des complications métaboliques, sans apporter l'effet d'une charge oxydante, j'ai utilisé pour mon projet de maîtrise un modèle animal nouveau-né où l'on voulait abaisser leurs défenses antioxydantes. Des cobayes ont donc reçu une diète déficiente en nutriments essentiels aux défenses antioxydantes durant leur première semaine de vie.

Ce chapitre-ci traite des nutriments essentiels aux défenses antioxydantes préalablement introduites dans le chapitre précédent. Les principales fonctions de ces nutriments et un aperçu des résultats de la littérature concernant les effets d'une carence seront discutés. L'accent sera mis sur le système du glutathion puisque celui-ci serait davantage impliqué chez les prématurés (3, 4). À noter qu'une déplétion en nutriments nécessaires aux autres antioxydants a aussi été implantée puisqu'ils ne pouvaient pas être négligés, même si ceux-ci sont couramment introduits dans les solutions de nutrition parentérale (cuivre, zinc, manganèse, vitamines C et E) avec ajustements en présence de complications (55). Le fer n'est normalement pas prescrit (toxicité associée), sauf en cas d'anémie (55).

3.1. Méthionine et cystéine : pour le glutathion

3.1.1. Métabolisme et fonctions

La méthionine est un acide aminé soufré indispensable ne pouvant qu'être obtenu par l'alimentation (56). Elle est nécessaire à la synthèse des protéines de l'organisme, tout comme les autres acides aminés, mais elle participe surtout à la synthèse de la cystéine et d'autres intermédiaires soufrés essentiels au métabolisme cellulaire.

La **figure 2** présente un résumé du métabolisme de la méthionine couplé aux métabolismes de la cystéine et de l'acide folique (57). L'activation de la méthionine par l'ATP engendre la formation du SAM qui est essentiel au processus de transméthylation pour la biosynthèse de la choline, la créatine, l'épinéphrine, la carnitine, les phospholipides, les protéines, l'ADN et l'acide ribonucléique (ARN) (57). Ce processus engendre la formation d'homocystéine. Ce dernier peut reformer la méthionine par reméthylation ou bien

synthétiser la cystéine par transsulfuration à l'aide de la sérine. Ces métabolismes sont grandement régulés. Des apports moindres en méthionine augmenteraient les niveaux de reméthylation de l'homocystéine en méthionine afin d'assurer des taux de SAM adéquats et abaisserait la transsulfuration de l'homocystéine en cystéine (57). De l'autre côté, une hausse des niveaux de SAM diminuerait la reméthylation de l'homocystéine en méthionine (inhibent la méthylène tétrahydrofolate réductase) et augmenterait la transsulfuration de l'homocystéine en cystéine (activent la cystathionine β -synthétase) (57). De plus, la voie de la transsulfuration est davantage activée en présence d'un statut redox plus oxydé (57, 58), ce qui augmente la synthèse de cystéine. Cette voie est aussi influencée par certaines hormones, soient activée par le glucagon (59) et inhibée par l'insuline (60).

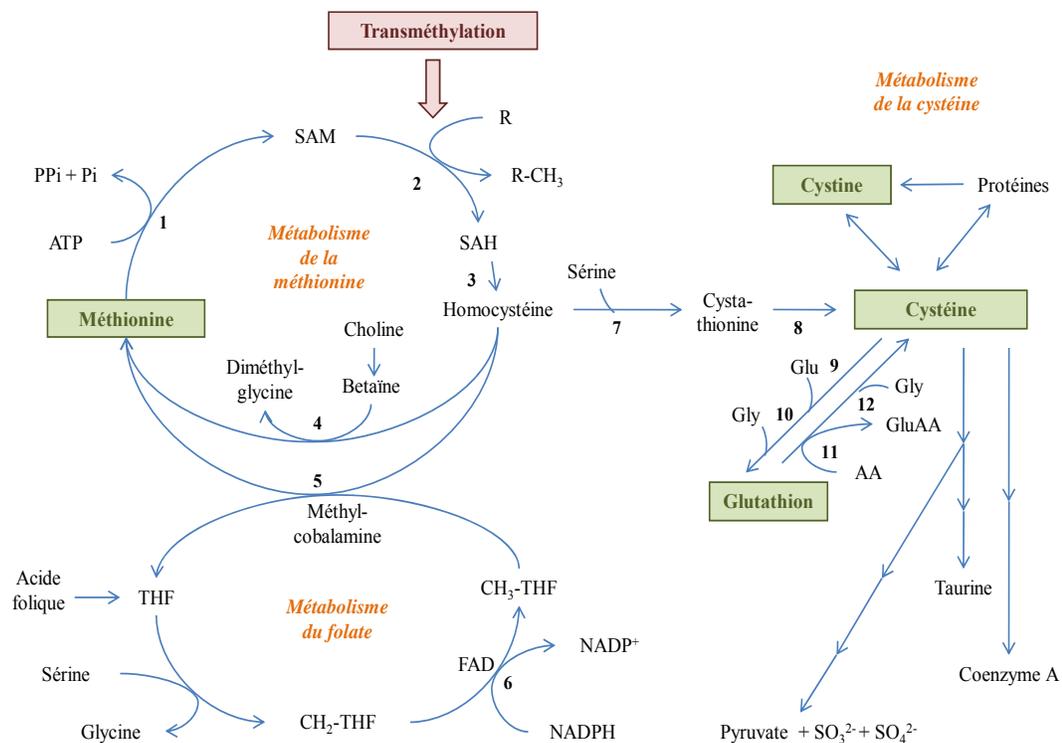
Ainsi, divers éléments peuvent influencer la formation de cystéine qui est essentielle à la synthèse du GSH. Cet acide aminé est aussi important pour la synthèse de protéines, taurine et coenzyme A (57). On retrouve parfois la forme oxydée de la cystéine (cystine; CySSyC) dans un environnement extracellulaire oxydé, tandis que la forme réduite (cystéine; CySH) se retrouve surtout dans le milieu intracellulaire (57).

La cystéine peut être obtenue exclusivement de la méthionine si les apports en ce dernier sont suffisants. Sinon, les besoins en cystéine peuvent être comblés en partie par la nutrition, réduisant ainsi les besoins en méthionine chez l'adulte, et ce, jusqu'à 64 % des besoins moyens estimés en acides aminés soufrés (méthionine + cystéine) (61). La disponibilité de la cystéine pour la synthèse de GSH dépendra à la fois des apports alimentaires, du catabolisme des protéines, ainsi que l'efficacité du foie à utiliser la méthionine pour synthétiser la cystéine par la voie de la transsulfuration (38).

Les apports quotidiens recommandés (AQR) d'acides aminés soufrés (méthionine + cystéine) sont de 19 mg/kg/jour chez l'adulte (62). Les AQR en période de croissance sont plus élevés, soient de 43 mg/kg/jour (7 à 12 mois) et diminuent graduellement par la suite, allant de 28 mg/kg/jour (1 an) à 19 mg/kg/jour (18 ans) (62). Les besoins en acides aminés soufrés chez les prématurés et les nouveau-nés sont encore à l'étude chez l'animal. Ils seraient moindres lors d'une alimentation parentérale comparativement à la voie entérale étant donné que les nutriments ne sont pas dirigés vers le métabolisme splanchnique au

premier passage (63-65). Il est d'ailleurs connu que la capacité des prématurés (66), et parfois des nouveau-nés (67), à convertir la méthionine en cystéine est limitée à cause d'une déficience en cystathionine γ -lyase. Malheureusement, la cystéine est rarement ajoutée au NP puisqu'elle s'oxyde facilement en sa forme disulfure (cystine) qui est insoluble en solution aqueuse (57). Cet aspect rend nécessaire le besoin de bien définir les besoins en cystéine par rapport à ceux de la méthionine et de trouver des moyens de combler ceux-ci.

Figure 2 : Liens entre les métabolismes de la méthionine, cystéine et folate.



Légende : 1) Adénosylméthionine transférase, 2) méthyltransférases, 3) adénosylhomocystéine hydrolase, 4) bêtaïne-homocystéine méthyltransférase, 5) méthionine synthétase, 6) méthylène tétrahydrofolate réductase, 7) cystathionine β -synthétase, 8) cystathionine γ -lyase, 9) γ -glutamylcystéine synthétase, 10) GSH synthétase, 11) γ -glutamyltranspeptidase, 12) dipeptidase. AA: acides aminés; CH₂: méthylène; CH₃: méthyle; Glu: glutamate; FAD: flavine adénine dinucléotide; Gly: glycine; NADPH/NADP⁺: nicotinamide dinucléotide phosphate sous forme réduite/oxydée; P_i: phosphate; P_{Pi}: diphosphate; R: molécule; SAH: S-adénosylhomocystéine; SAM: S-Adénosylméthionine; SO₃²⁻: sulfite; SO₄²⁻: sulfate; THF: tétrahydrofolate,

3.1.2. Effets d'une déficience

Il est évident qu'une restriction en méthionine venant perturber la synthèse en cystéine contrecarrerait la synthèse de GSH hépatique (56, 68), d'autant plus que le peu de cystéine formé serait prioritairement utilisé pour la synthèse protéique (69). En effet, la γ -glutamylcystéine synthétase (première étape de la synthèse du GSH) a une affinité pour la cystéine plus faible ($K_m = 0,35 \text{ mM}$) que la L-cystéinyle-tRNA synthétase (synthèse des protéines) qui possède un K_m deux fois plus bas (69) ou même cinq fois plus bas selon une autre référence (70). Ainsi, la γ -glutamylcystéine synthétase a besoin davantage de cystéine pour son activité.

Autre que l'atteinte des défenses antioxydantes, un élément dont il est important de tenir compte c'est l'impact sur le taux de croissance en période de développement. Ceci est évident étant donné le rôle essentiel de la méthionine et de la cystéine à la synthèse protéique, ainsi que l'importance du GSH dans les fonctions thyroïdiennes (cofacteur dans la déiodination de l'hormone thyroïdienne tyroxine (T_4) en triiodothyronine (T_3)) affectant ainsi les hormones de croissance (71, 72). Il est aussi intéressant de noter qu'une déficience en méthionine en période fœtale et néonatale pourrait avoir un impact sur la quantité de SAM formé au foie. Comme abordé précédemment, le SAM est nécessaire à la méthylation de l'ADN et il s'avère que des taux abaissés en SAM causeraient une hypométhylation de certains gènes (24) pouvant avoir des répercussions métaboliques à long terme. Ce point sera discuté plus loin dans le chapitre 5 accordé à la programmation.

3.2. Sélénium : pour la glutathion peroxydase

3.2.1. Métabolisme et fonctions

Le sélénium est obtenu des aliments sous forme de séléméthionine, de sélénocystéine ainsi que de sélénium inorganique (sélénate, sélénite). Le sélénométhionine entre dans la composition des protéines tout comme la méthionine. Quant au sélénium de la sélénocystéine, il est chimiquement très réactif et possède des fonctions catalytiques dans les protéines (sélénoprotéines). Suite à leurs apports, toutes ces formes permettent de fournir du sélénium à la réserve hépatique et d'être converties en sélénocystéine afin d'être utilisées pour la synthèse des sélénoprotéines (73, 74).

Parmi les sélénoprotéines les plus connues, on retrouve la sélénoprotéine-P qui sert au transport du sélénium plasmatique et elle est aussi associée aux cellules endothéliales de certains tissus (foie, reins, cerveau) (75). De plus, il existe les thioredoxines réductases qui permettent de réduire diverses enzymes, notamment celles de la défense antioxydante (76), la sélénoprotéine-W qui serait impliquée dans la défense contre le stress oxydant (77), les sélénophosphates synthétases impliquées dans le métabolisme du sélénium (78) et enfin, les GSH-Px (79). En présence d'une déficience en sélénium, la plupart de ces sélénoprotéines seront affectées (73). Étant donné leur grande importance biologique, c'est surtout l'activité de la GSH-Px et les niveaux de sélénoprotéine-P plasmatiques qui servent à établir le statut nutritionnel en sélénium. D'ailleurs, l'activité des GSH-Px du plasma et du foie sont très sensibles à la disponibilité du sélénium (73).

Les AQR chez les adultes sont de 55 µg/jour et basé sur l'activation maximale de la GSH-Px plasmatique (73). Les apports adéquats des nouveau-nés sont établis à 15 µg/jour, et ce, jusqu'à 6 mois, pour ensuite augmenter graduellement jusqu'aux valeurs adultes. Ces apports adéquats ont été choisis d'après le contenu en sélénium du lait humain et des aliments solides pour les enfants de 0 à 1 an en santé, pour ensuite être extrapolés des valeurs déterminées chez les adultes (73).

3.2.2. Effets d'une déficience

Une déficience en sélénium (durée de 1 à 2 mois) a permis de créer une baisse dans l'activité de la GSH-Px hépatique chez de jeunes cobayes et des rats (80-82). Il est largement reconnu qu'une déficience en sélénium entraîne une baisse de l'activité de cette enzyme chez l'humain (73, 79). Ce qui est encore mal compris, c'est qu'une déficience en sélénium est associée à une hausse de la synthèse de GSH hépatique, ainsi que des niveaux de GSH plasmatiques chez l'animal (83, 84). Ceci pourrait être expliqué par une atteinte du métabolisme de la méthionine au niveau du recyclage de la méthionine et de la voie de transsulfuration (84). Mais cette hausse du GSH plasmatique n'a pas été observée dans une étude effectuée chez le cobaye (82). D'ailleurs, cette étude avait noté qu'une déficience en sélénium et vitamine C combinée entraînait une baisse dans les concentrations de vitamine E tissulaire, dont le foie.

Autre que l'atteinte des défenses antioxydantes, il est important de noter qu'une déficience en sélénium affecte aussi le taux de croissance chez l'animal étant donné l'incorporation du sélénium dans la sélénoprotéine iodothyronine déiodinase, nécessaire à la conversion de la de la tyroxine (T_4) en triiodothyronine (T_3) (85, 86). De plus, une déficience combinée en sélénium et en vitamine E est associée à une peroxydation lipidique du muscle (hausse des niveaux d'isoprostanes) engendrant une myopathie fatale chez de jeunes cobayes (80), ainsi qu'une nécrose du foie chez le rat (73). En fait, la déficience en sélénium n'est normalement pas visible, mais rend l'organisme plus fragile en cas de stress tel que d'autres déficiences en nutriments (vitamine C, vitamine E, acides aminés, etc.) (73).

3.3. Riboflavine : pour la glutathion réductase

3.3.1. Métabolisme et fonctions

Une fois absorbée, la riboflavine peut se lier à diverses protéines pour circuler dans le plasma, dont l'albumine et des immunoglobulines, ou bien elle peut être phosphorylée au cours de son absorption intestinale, la rendant ainsi sous forme active nommée flavine mononucléotide (FMN). Dans la plupart des cas, ce FMN se lie à une AMP afin de devenir une FAD. La formation du FMN et FAD s'effectue dans la plupart des tissus, surtout au niveau du petit intestin, foie, cœur et reins. La FMN et majoritairement la FAD sont des coenzymes pouvant se complexer à des protéines afin de former diverses flavoprotéines, dont la GSSG-R (87, 88). La flavine de ces flavoprotéines participe aux réactions d'oxydoréduction de plusieurs voies métaboliques ainsi qu'au niveau de la chaîne respiratoire (87).

Les flavoprotéines sont grandement influencées par le statut nutritionnel en riboflavine (87). La façon la plus commune d'évaluer ce statut est de mesurer le coefficient d'activité de la GSSG-R à partir d'un lysat frais de globules rouges avant et après l'ajout de FAD. Ce qui permet de mesurer le niveau de stimulation de l'enzyme en présence de FAD et plus le coefficient est grand, plus le statut en riboflavine est pauvre (89). Les AQR en riboflavine sont déterminés à partir de la normalisation de ce coefficient chez l'adulte, soit de 1,1 et de 1,3 mg riboflavine/jour chez les femmes et les hommes respectivement. Les apports adéquats sont de 0,3 mg/jour chez les 0 à 6 mois, établis à partir des apports moyens en lait

et les AQR pour les 7 mois à 18 ans augmentent progressivement et sont extrapolés des valeurs de l'adulte en tenant compte du taux de croissance (87).

3.3.2. Effets d'une déficience

Il est déjà bien établi qu'une déficience en riboflavine influencera l'activité de la GSSG-R du globule rouge chez l'humain (87, 89-92), ainsi que l'activité de la GSSG-R hépatique chez l'animal (93, 94).

Autre que les effets au niveau de l'activité de la GSSG-R, une déficience modérée en riboflavine durant 4 jours a entraîné une diminution de la prolifération cellulaire sur des cellules HepG2 (95). Ainsi, le développement normal des cellules hépatiques peut être affecté par cette déficience. De plus, tout comme plusieurs autres vitamines du complexe B, une déficience importante en riboflavine (vitamine B₂) est associée à divers troubles dermatologiques (dermatite séborrhéique, stomatite angulaire, glossite, œdème du pharynx) et hématologiques (hyperhémie, anémie normocytaire et normochromique) (87).

3.4. Cuivre, zinc et manganèse : pour les superoxydes dismutases

3.4.1. Métabolisme et fonctions

Le cuivre et le zinc font partie intégrante de la CuZn-SOD et EC-SOD. Le cuivre (Cu²⁺) participe à l'activité catalytique de plusieurs cupro-enzymes par le processus d'oxydoréduction (96). Ces cupro-enzymes exercent des fonctions biologiques diverses : formation du tissu conjonctif, métabolisme du fer, formation et maintien du système nerveux central, synthèse de la mélanine, fonctions immunitaires et cardiaques, ainsi que la défense antioxydante (96). L'évaluation du statut nutritionnel en cuivre peut être faite de diverses façons : niveaux sériques en cuivre, niveaux de céruloplasmine (transport du cuivre), activité ou taux de SOD érythrocytaire (97-99).

Le zinc possède plusieurs fonctions, dont structurales, principalement au niveau des protéines à doigts de zinc (pour divers facteurs de transcription) ainsi que d'autres protéines, dont la CuZn-SOD (100). Ses autres fonctions sont d'ordre catalytique (cofacteur d'enzymes) et régulateur de l'expression génique (liaison à divers facteurs de transcription) (100). La meilleure façon d'évaluer le statut nutritionnel en zinc est de mesurer le taux de

zinc plasmatique et les niveaux de métallothionéine (lie le zinc) dans le plasma. Ce dernier indicateur reflète bien le niveau de métallothionéine hépatique qui est proportionnel au statut en zinc du foie (101).

Le manganèse est un cofacteur de la Mn-SOD et active plusieurs autres enzymes possédant des fonctions carboxylases, hydrolases, kinases et transférases (102). Le manganèse ne serait pas essentiel pour chacune de ces enzymes puisque d'autres métaux peuvent le substituer (102). Ces enzymes participent à la défense antioxydante, au métabolisme de l'os, au métabolisme des lipides et à la néoglucogenèse (102). Les taux de manganèse érythrocytaire serait la meilleure mesure du statut en manganèse puisqu'il représente 60 à 80 % du manganèse du sang total et celui-ci reflète bien les réserves tissulaires (103). L'activité de la Mn-SOD lymphocytaire et les niveaux de manganèse sérique seraient aussi de bons indices du statut en manganèse (104), mais les apports en lipides, principalement polyinsaturés, seraient un facteur confondant (104, 105).

3.4.2. Effets d'une déficience

Il est très rare d'observer une déficience en cuivre chez l'humain puisque celle-ci doit être importante et de longue durée afin de dépleter tout le cuivre de l'organisme (96). Une déficience en cuivre abaisse l'activité et les niveaux de SOD des globules rouges chez l'humain (97-99). Elle abaisse aussi l'activité, les niveaux de protéines et d'ARN messager de la CuZn-SOD hépatique chez le rat sevré comparativement à une hausse pour la Mn-SOD (106). De plus, cette déficience entraînerait une hausse du GSH hépatique (107, 108), expliquée par une hausse de sa synthèse (108), de même qu'une baisse dans l'activité de la GSH-Px (109). Une restriction en cuivre serait aussi associée à l'anémie, l'ostéoporose, la neutropénie (96), l'hypercholestérolémie et l'hypertriglycémie (110, 111).

Quant au zinc, l'organisme s'adapte à une déficience moyenne en diminuant son excrétion (adulte) ou en ralentissant la croissance (enfant). C'est lorsqu'il y a une déficience sévère que le zinc tissulaire sera déplété (101). Le foie est parmi les tissus où le zinc est prioritairement déplété aux dépens du muscle (101). La CuZn-SOD érythrocytaire ne serait pas une bonne mesure du statut en zinc (100). D'autres ont rapporté que son activité et ses niveaux d'expression seraient tout de même abaissés chez l'animal en croissance déficient en zinc (112, 113). Une déficience sévère en zinc peut aussi entraîner diverses

complications : retard de croissance, diarrhée, lésions cutanées et oculaires, déficiences immunitaires, anorexie, diminution de la cicatrisation et perte de cheveux (100).

Chez l'animal, le contenu en manganèse hépatique corrèle avec les niveaux d'expression et d'activité de la Mn-SOD (114). Il semble toutefois difficile de statuer sur l'effet qu'aurait une déficience en manganèse sur la Mn-SOD hépatique puisqu'une baisse de son expression est rapportée (115) tandis que son activité hépatique ne serait pas changée en absence de diabète ou bien augmentée avec la présence de diabète (116). Ainsi, une déficience en manganèse semble avoir différents effets selon le type de tissus analysé et l'environnement entourant la déficience en manganèse (maladie présente, apports en acides gras polyinsaturés) (105, 116). Étrangement, une déficience en manganèse a été associée avec une intolérance au glucose (117, 118) chez l'animal et à un abaissement du cholestérol plasmatique chez l'humain et l'animal (102, 105, 119). Ce dernier aspect pourrait être expliqué par une dysfonction dans la sécrétion de cholestérol hépatique (avec accumulation de cholestérol au foie) ou bien par une baisse de l'activité enzymatique du mévalonate kinase et farnésyle pyrophosphate synthétase (le manganèse serait un cofacteur) impliquées dans les dernières étapes de la synthèse du cholestérol (105).

3.5. Fer : pour la catalase

3.5.1. Métabolisme et fonctions

Le fer entre dans la composition de la catalase. Ce fer peut se lier à une porphyrine afin de former l'hème qui est essentielle pour la formation de l'hémoglobine et de la myoglobine (captage et transport de l'oxygène), des cytochromes de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale (production d'énergie), ainsi que des enzymes peroxydases et de la catalase. Le fer peut aussi former un complexe fer-soufre dans diverses enzymes, dont l'aconitase qui est essentiel à la production d'énergie par le cycle de Krebs (conversion du citrate en isocitrate). Une déplétion en fer entraîne une déficience qui mènera éventuellement à développer une anémie. Cette condition s'installe à long terme et s'effectue en diverses étapes pouvant être suivies en mesurant des paramètres sériques (hémoglobine, fer, ferritine, saturation de la transferrine, etc.). L'activité de certaines enzymes contenant le fer peut être affectée par une déficience en fer, mais ces enzymes ne seraient pas sensibles de la même façon, ce qui n'en fait pas une bonne mesure clinique du statut en fer (120).

3.5.2. Effets d'une déficience

La catalase serait relativement résistante à une déplétion en fer, comparativement à l'aconitase et le cytochrome c qui sont rapidement affectés (120). D'ailleurs, deux études chez l'animal avaient démontré qu'une déficience en fer avait entraîné une hausse des niveaux de glucose et de lactate sérique accompagnée d'une hausse de la néoglucogenèse chez ces animaux, ce qui les rendait dépendants du glucose comme source d'énergie (121, 122). D'où une possible dysfonction du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative pour fournir l'énergie nécessaire au fonctionnement normal du métabolisme. La déficience en fer peut exister avec ou sans présence d'anémie, mais c'est surtout lorsque l'anémie s'installe que les dysfonctions fonctionnelles apparaissent et affecteront les fonctions cognitives, l'immunité, la capacité au travail et le contrôle de la température corporelle (120). Malheureusement, en période néonatale, l'anémie est souvent retrouvée chez les prématurés, surtout ceux recevant une NP non supplémentée en fer durant une longue période (55).

3.6. Antioxydants exogènes : vitamines C et E, β -carotène

3.6.1. Métabolisme et fonctions

La vitamine C est un agent réducteur qui cède un à deux électrons formant ainsi l'acide déshydroascorbique. Ce dernier est stable et peut être réduit à nouveau en acide ascorbique, à l'aide du GSH, ou bien métabolisé pour son excrétion. Cette vitamine est bien connue comme un antioxydant hydrosoluble permettant de réduire les radicaux libres, ainsi que la vitamine E oxydée. (123). Ses fonctions réductrices sont essentielles au maintien de divers métaux, dont le fer et le cuivre, sous leur forme réduite et où ceux-ci participent comme cofacteurs d'enzymes, dont les monooxygénases et dioxygénases. La vitamine C participe donc au niveau de la synthèse du collagène, de la carnitine et des catécholamines, ainsi que dans le métabolisme de la tyrosine et dans les fonctions immunitaires (123). Elle est d'ailleurs essentielle pour l'activité de la proline hydroxylase, enzyme impliquée dans la dégradation du HIF-1 α (124, 125) et où son rôle sera abordé dans le chapitre 4 concernant le métabolisme de l'énergie hépatique.

La vitamine E est liposoluble et elle est capable de réduire rapidement les radicaux peroxydes avant que ceux-ci n'attaquent les acides gras polyinsaturés présents dans les membranes lipoprotéiques et cellulaires. Comme discuté précédemment, elle devient sous forme oxydée (radical tocophéroxyde) suite à la perte d'un électron et reviendra sous sa forme réduite à l'aide de la vitamine C et des thiols, dont le GSH. Le principal lieu de réserve de l' α -tocophérol se situe dans les gouttelettes lipidiques des tissus adipeux et le système nerveux, mais les réserves plus labiles se situent dans les lipoprotéines, les érythrocytes et le foie (49).

Concernant le β -carotène, ses fonctions ont été introduites dans le chapitre précédent. Dans le cadre de mon projet de maîtrise, le β -carotène (provitamine A) a été retiré de la diète déficiente étant donné qu'il possède des fonctions antioxydantes, quoique la majeure partie serait convertie en rétinol (vitamine A) à la suite de son absorption (126). Quant au rétinol, celui-ci n'a pas été retiré de la diète en question puisqu'il ne possède pas d'activité antioxydante. Une fois que le β -carotène est converti en rétinol et en acide rétinoïque, ces diverses formes de vitamine A peuvent exercer leurs rôles au niveau de la vision et de la différenciation cellulaire (126). Le β -carotène n'est normalement pas ajouté aux solutions de nutrition parentérale, mais il s'avère que la déficience en rétinol est problématique chez les prématurés (55, 127) et associée à des complications pulmonaires (127).

3.6.2. Effets d'une déficience

Les prématurés sont grandement susceptibles d'avoir une déficience en vitamine C et E, puisque les concentrations de celles-ci augmentent chez le fœtus au cours du troisième trimestre de grossesse (6), les rendant ainsi plus susceptibles aux dommages oxydatifs. Une diète déficiente en vitamine C durant 3 semaines chez des cobayes nouveau-nés a entraîné une chute des niveaux d'acide ascorbique hépatique ainsi qu'une baisse des niveaux de tocophérol, glutathion et SOD dans le foie (128). Cette perturbation du système antioxydant avait conduit à une hausse de l'oxydation de protéines, mais pas des lipides et de l'ADN. Chez l'adulte en santé, une déficience en vitamine C survient après 30 jours avec une diète déplétée en cette vitamine et il y aurait développement du scorbut après 2 à 3 mois de carence, caractérisée par des hémorragies cutanées, oculaires et gingivales, des enflures, des anomalies articulaires et squelettiques, une dépression, de la fièvre et un retard de

cicatrisation (123). Lors d'une déficience en vitamine E chez des cobayes sevrés, ceux-ci ont développé des dommages musculaires après 4 à 5 semaines (80) et lorsque combinée avec une déficience en vitamine C ces cobayes développaient des dommages au système nerveux central (129), subissaient une paralysie des membres et parfois le décès à partir du cinquième jour, et ce, avant même le développement d'un scorbut (130).

4. Le métabolisme de l'énergie hépatique

Afin de comprendre l'effet que peut avoir un stress oxydant sur les complications du métabolisme de l'énergie, il est important de comprendre les joueurs clés ainsi que leurs fonctions. Ce chapitre-ci y est dédié.

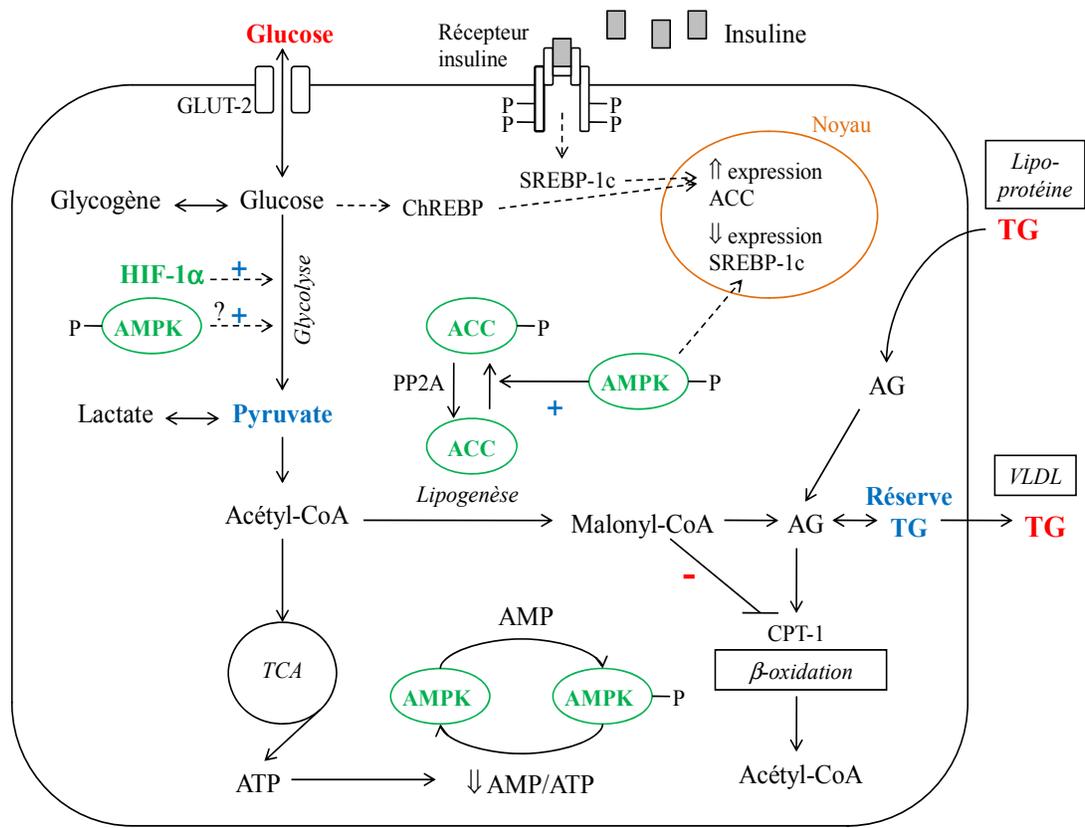
Les principaux substrats énergétiques de la cellule sont le glucose et les acides gras. Il existe d'importants mécanismes régulateurs qui coordonnent l'utilisation de ces substrats et un dérèglement de ces contrôles est souvent rencontré dans le cas de diabète de type II, d'obésité, de triglycéridémie et de syndrome métabolique. Le foie a un rôle important à jouer, soit de contrôler le glucose sanguin, que ce soit en augmentant l'entrée du glucose (état postprandial après un repas) ou en favorisant la production de celui-ci (état de jeûne entre les repas). De ce fait, le métabolisme de l'énergie est grandement impliqué dans cette régulation. La **figure 3** présente un résumé du métabolisme de l'énergie hépatique avec les joueurs clés (**en vert**), les produits des voies métaboliques (**en bleu**) et les substrats énergétiques (**en rouge**) qui seront étudiés dans ce mémoire.

4.1. Mécanismes régulateurs

Évidemment, les hormones sont très impliquées dans la régulation du métabolisme de l'énergie, dont l'insuline favorisant la voie anabolique (synthèse du glycogène, stimulation de la glycolyse et de la lipogenèse), ainsi que le glucagon stimulant la voie catabolique (stimulation de la glycolyse et de la néoglucogenèse) et ce, afin de pouvoir maintenir la glycémie à des niveaux optimaux (131). Ainsi, les voies de signalisation déclenchées par ces hormones permettent de contrôler l'activité des enzymes de diverses voies métaboliques. Un autre élément en jeu concerne les niveaux d'ATP produit par la cellule et qui peuvent, eux aussi, réguler certaines voies métaboliques (132). Ce dernier aspect est davantage abordé dans cet écrit et son importance sera discutée un peu plus loin dans ce chapitre.

En ce qui a trait au contexte de notre étude, le rôle que pourrait jouer l'activation de la glycolyse et de la lipogenèse dans la hausse de la triglycéridémie observée chez les prématurés subissant un stress oxydant est à étudier et sera donc davantage abordé ici.

Figure 3. Résumé du métabolisme énergétique hépatique



Légende : ACC : acétyl-CoA carboxylase; AG : acides gras; AMP : adénosine monophosphate; AMPK : protéine kinase activée par l'AMP; ATP adénosine triphosphate; ChREBP : *carbohydrate response element binding protein* (facteur de transcription); CPT-1 : carnitine palmitoytransférase-1; GLUT-2 : transporteur de glucose-2; HIF-1α : *hypoxia inducible facteur-1 alpha* (facteur de transcription); PP2A : protéine phosphatase de type 2A; TCA : cycle de l'acide tricarboxylique (cycle de Krebs); TG : triglycéride; SREBP-1c : *sterol regulatory element binding protein-1c* (facteur de transcription).

4.1. La voie de la glycolyse au niveau hépatique

Cette voie favorise la production d'énergie par l'utilisation du glucose, et ce, couplée au cycle de Krebs (TCA : cycle tricarboxylique). Elle est normalement priorisée lorsqu'il y a un grand besoin d'ATP. Dans le cas contraire, le glucose sera davantage utilisé pour établir des réserves en étant converti en glycogène (voie de la glycogénèse) ou bien en fournissant des produits intermédiaires de la glycolyse pour la production de TG (voie de la lipogenèse).

4.1.1. L'entrée du glucose sanguin dans les hépatocytes et formation du pyruvate

Le transporteur de glucose GLUT-2 est le principal transporteur des cellules hépatiques et, contrairement aux autres types de transporteurs GLUT (dont le GLUT-4 dans les cellules musculaires et adipeuses), il possède une faible affinité pour le glucose ($K_m = 20 \text{ mM}$) (133, 134). C'est donc en condition postprandiale (hausse de la glycémie) que le glucose entrera plus facilement dans la cellule hépatique, tandis qu'en période de jeûne, les concentrations de glucose seront plus élevées dans la cellule hépatique par rapport au niveau extracellulaire (suite à la néoglucogénèse et la glycogénolyse) permettant ainsi le transport du glucose en dehors de la cellule par le transporteur GLUT-2 et ce, afin de maintenir la glycémie à des niveaux normaux (133). D'après un article de *Eisenberg et al.* (135), le GLUT-2 et le récepteur insulinique formeraient un seul et même complexe qui, lorsque la voie de l'insuline est activée, le complexe entier (récepteur de l'insuline et le GLUT-2) se détacherait de la membrane plasmatique par endocytose pour être dégradé. Environ 15 à 53 % des GLUT-2 seraient internalisés en condition postprandiale et ce phénomène aiderait à prévenir que le glucose soit exporté des hépatocytes vers la circulation sanguine dans les conditions d'hyperglycémie et d'hyperinsulinémie. Ce qui est très différent des GLUT-4 qui se lieront à la membrane plasmatique suite à l'activation de la voie insulinique afin de permettre l'entrée du glucose dans les cellules musculaires et adipeuses (133).

Côté hormonal, la liaison de l'insuline et du glucagon à leur récepteur déclenche les diverses voies de signalisation précédemment introduites et ceci décidera de la façon dont le glucose sera utilisé. Un préliminaire à l'initiation de la glycolyse est la phosphorylation du glucose par la glucokinase, suivie par l'isomérisation du glucose-6-P en fructose-6-P (136). L'initiation de la glycolyse s'effectue par la phosphofructokinase (enzyme limitante de la glycolyse) qui ajoutera un deuxième phosphate au fructose-6-P. L'activité de la phosphofructokinase est régulée allostériquement par l'AMP (activation; besoin d'ATP), ainsi que l'ATP (rétro-inhibition; produit final de la glycolyse) (136). En fin de voie glycolytique, la pyruvate kinase fournira le pyruvate qui sera transporté dans la mitochondrie et converti en acétylcoenzyme A (en présence d'oxygène; aérobiose).

4.1.2. Conversion du pyruvate en acétyl-CoA

La conversion du pyruvate en acétylcoenzyme A (acétyl-CoA) s'effectue par la pyruvate déshydrogénase qui est un complexe multienzymatique dans la mitochondrie. La première étape du cycle de Krebs est alors initiée par la synthèse de citrate. À cette étape, dépendamment des besoins énergétiques de la cellule, le citrate restera dans le cycle de Krebs pour fournir davantage d'ATP et si ce n'est pas le cas, le citrate sera véhiculé hors de la mitochondrie (transporteur de citrate/isocitrate) pour reformer de l'acétyl-CoA nécessaire à la synthèse des lipides et stérols (136, 137). Il est important de noter que lorsque les besoins en énergie sont augmentés, en plus du glucose, la β -oxydation mitochondriale des acides gras fournit aussi de l'acétyl-CoA au cycle de Krebs. De plus, la néoglucogenèse permet d'apporter certains acides aminés dans le but de fournir de l'ATP, soit en conduisant à la formation de pyruvate pour synthétiser l'acétyl-CoA (alanine, sérine, cystéine) ou en étant des précurseurs de certains intermédiaires du cycle de Krebs (glutamate, proline, arginine, histidine, valine, isoleucine, aspartate) (136). À noter que le pyruvate peut être converti en lactate en absence d'oxygène (anaérobiose), ce qui forme moins d'ATP que lorsque le pyruvate fournit le carbone nécessaire au cycle de Krebs.

4.1.3. Le hypoxia inducible factor-1 α : activateur de la glycolyse et modulé par un stress oxydant

Le HIF-1 α est une protéine qui est constitutivement exprimée dans divers tissus dont le foie (138-140). En condition hypoxique, le HIF-1 α est transporté du cytoplasme vers le noyau où il se liera avec le HIF-1 β qui est séquestré dans le noyau (141). À l'aide d'un co-activateur, l'hétérodimère HIF-1 α/β se liera à un promoteur sensible à l'hypoxie (HRE : *hypoxia response element*) de divers gènes et activera ainsi leur expression génique. Ce qui est le cas de protéines impliquées dans l'angiogenèse (EPO : érythropoïétine, VEGF : *vascular endothelial growth factor*) et plusieurs enzymes de la glycolyse, dont l'aldolase-A, la phosphoglycérate kinase-1, la pyruvate kinase-M et la phosphofructo-1-kinase (142, 143). Bien que le promoteur sensible à l'hypoxie se retrouve sur la plupart des enzymes glycolytiques, l'induction de leur expression par la stimulation du HIF-1 α en condition hypoxique n'a pas été confirmée pour chacune d'elle (142). En condition normoxique, des prolines du HIF-1 α seront hydroxylées (OH-P-HIF-1 α) par une proline hydroxylase, ce qui déclenche les mécanismes de dégradation du HIF-1 α par les protéasomes. Il est important

de noter que l'activité de la proline hydroxylase nécessite la présence d'O₂, de Fe²⁺, de 2-oxoglutarate et de la vitamine C (124, 125).

Avec des études *in vitro* de cultures cellulaires, il a été rapporté que la présence de ROS peut augmenter les niveaux de HIF-1 α (23) et cette hausse serait expliquée par l'inactivation des prolines hydroxylases par l'oxydation du Fe²⁺ en Fe³⁺, ce qui est le cas du H₂O₂ (22). Ce phénomène est indépendant des niveaux d'O₂ cellulaire. La vitamine C permet de réduire le Fe³⁺ en Fe²⁺ et rétablit ainsi l'activité des prolines hydroxylases et donc la dégradation du HIF-1 α (125). D'ailleurs, il a été rapporté que la cystéine, l'histidine et le GSH peuvent aussi aider à la réduction du Fe³⁺ en Fe²⁺ (124). Ainsi, *in vivo*, il serait fort possible que la présence d'un stress oxydant via une déficience en vitamine C ou une baisse des concentrations de GSH intracellulaire entraînent une hausse des niveaux de HIF-1 α , via l'inactivation des prolines hydroxylases. Ce qui activerait davantage la voie de la glycolyse, où l'acétyl-CoA en est le produit final. Une hausse des niveaux d'acétyl-CoA, dans le cas où les besoins énergétiques sont moindres, entraînerait l'activation de la voie de la lipogenèse par l'augmentation de son substrat.

4.2. La voie de la lipogenèse

Deux enzymes importantes sont impliquées dans cette voie cytosolique, soit l'ACC et l'AMPK. Face à l'accroissement de l'incidence d'obésité, de diabète de type II et du syndrome métabolique, il y a un intérêt grandissant quant aux moyens pouvant contrôler la voie de la lipogenèse et de la β -oxydation. Donc, la régulation de l'activité de l'ACC et de l'AMPK est une cible intéressante pour le développement d'interventions thérapeutiques (144-147). Le rôle que ces enzymes auraient à jouer concernant l'hypertriglycémie du prématuré subissant un stress oxydant devient majeur.

4.2.1. L'acétyl-CoA carboxylase: enzyme régulatrice de la lipogenèse

Diverses revues de la littérature portent sur la régulation et les fonctions de l'ACC (144, 145, 148, 149). Celle-ci catalyse la carboxylation de l'acétyl-CoA pour produire le malonyl-CoA où le CO₂ provient du glutamate. Il existe deux isoformes d'ACC, soit l'ACC-1 et l'ACC-2. Le premier isoforme est davantage exprimé dans le foie, les cellules

adipeuses et les glandes mammaires. Cet isoforme se retrouve dans le compartiment cytosolique et est l'étape limitante dans la synthèse des acides gras. Ainsi, le malonyl-CoA obtenu par cette enzyme sera davantage utilisé pour la synthèse des acides gras, réaction catalysée par l'acide gras synthétase. Ces acides gras peuvent être incorporés dans les TG et les phospholipides. L'ACC-2 correspond à 25 % de l'ACC total hépatique (148). Elle se retrouve dans la membrane externe de la mitochondrie et le malonyl-CoA formé par cette voie inhibe la carnitine palmitoyltransférase-1 (CPT-1), ce qui diminue l'incorporation des acides gras à chaîne longue dans la mitochondrie et abaisse ainsi leur β -oxydation (144, 150). Ceci favorise le stockage d'énergie dans les réserves de TG plutôt que la production d'ATP.

L'expression de l'ACC est activée par divers facteurs de transcription, dont le *sterol regulatory element binding protein-1c* (SREBP-1c) par la voie de signalisation de l'insuline et ce, combiné aux effets du *carbohydrate response element binding protein* (ChREBP) en présence d'une diète élevée en glucides (148, 151). De plus, il existe plusieurs promoteurs de l'ACC chez l'humain et permettrait d'obtenir divers isoenzymes de l'ACC, dont un promoteur-3 qui code pour une ACC-1 plus courte et qui manque le site de phosphorylation de l'AMPK (149, 152), ce qui diminuerait donc son inhibition par l'AMPK.

L'activité de l'ACC peut être modulée par divers modulateurs allostériques. Elle est activée par des intermédiaires du cycle de Krebs, dont le citrate qui est le précurseur de l'acétyl-CoA cytosolique, mais inhibée par des acides gras à chaîne longue qui sont des produits de la lipogenèse (144). L'ACC peut être aussi modulée par son état de phosphorylation. L'ACC déphosphorylée est la forme active de l'enzyme et la protéine phosphatase de type 2A (PP2A) assure sa déphosphorylation (153). Le glutamate peut activer l'ACC allostériquement (154), mais il est surtout connu comme étant un facilitateur à sa déphosphorylation par la protéine phosphatase de type 2A (153). L'ACC est inactivée par phosphorylation via l'AMPK. Cette dernière enzyme est très importante dans l'inhibition de la voie de la lipogenèse.

4.2.2. La protéine activée par l'AMP: enzyme régulant l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase

L'AMPK est une enzyme hétérodimérique possédant une unité α catalytique et deux autres unités régulatrices β et γ (155). Le complexe catalytique doit être phosphorylé par une protéine kinase en amont (AMPKK) avant de pouvoir être activée allostériquement par l'AMP, possiblement au niveau de son unité γ (155, 156). Par contre, l'AMPK peut être inactivée par une hausse des niveaux d'ATP (156, 157). Ainsi, elle est activée par une hausse du ratio AMP/ATP en présence de divers stress cellulaires qui augmentent la consommation d'ATP (choc thermique, exercice, contraction musculaire (132)) ou bien qui inhibent la production d'ATP (certains poisons, hypoxie, ischémie, déficit en glucose) (155).

La fonction principale de l'AMPK activée est de phosphoryler à son tour des protéines, surtout des enzymes, dans le but de les activer ou de les inhiber. Globalement, le rôle de l'AMPK en tant que régulatrice du métabolisme de l'énergie se manifeste par l'inhibition des voies anaboliques consommatrices d'ATP (production de glucose, synthèse des acides gras, du cholestérol, du glycogène et des protéines) et l'activation des voies cataboliques productrices d'ATP (facilite l'entrée du glucose et hausse de la glycolyse et de la β -oxydation).

Plusieurs revues de littérature rédigées par l'équipe de *Hardie DG* résument bien la régulation et le rôle de l'AMPK dans la cellule (155, 158, 159). Au niveau hépatique, il s'avère que l'AMPK diminue l'expression d'enzymes de la néoglucogenèse (phosphoénolpyruvate carboxykinase, glucose-6-phosphatase) de même que celles impliquées dans la synthèse des lipides (acides gras synthétase, ACC-1) où ce dernier effet serait attribuable à une baisse de l'expression du facteur de transcription SREBP-1c (159). Ainsi, l'ACC-1 peut être à la fois inhibée par phosphorylation en plus de l'inhibition exercée au niveau de l'expression de son gène. L'AMPK peut aussi rendre l'ACC-2 et l'HMG-CoA (3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA) réductase inactives, ce qui stimulerait l'oxydation des acides gras et inactiverait la synthèse du cholestérol respectivement. D'autres effets ont été rapportés suite à l'activation de l'AMPK dans d'autres tissus (dont le muscle), soit l'augmentation de l'expression des transporteurs de glucose GLUT, la

stimulation de la glycolyse (160, 161), l'inhibition de la synthèse protéique et du glycogène, l'activation et/ou l'inhibition de certains facteurs de transcriptions, ainsi que l'inhibition de la croissance et de la prolifération cellulaire (155, 158, 159, 162). Il ne semble pas avoir été rapporté que l'AMPK puisse augmenter l'expression du transporteur GLUT-2 dans le foie. Toutefois, à travers son rôle d'inhibiteur de la néoglucogenèse, l'AMPK pourrait peut-être empêcher la hausse des niveaux de glucose dans les hépatocytes, favorisant l'entrée du glucose par le transporteur GLUT-2 plutôt que sa sortie.

Ainsi, l'AMPK exerce un grand rôle dans le contrôle du métabolisme énergétique hépatique. Si l'on revient dans le contexte de notre hypothèse de départ, une hausse d'ATP provenant d'une stimulation de la glycolyse (hausse du HIF-1 α) créerait une inactivation de l'AMPK. L'ACC-1 et l'ACC-2 resteraient actives faute d'inhibition normalement exercée par l'AMPK. Ce qui hausserait la formation de malonyl-CoA, précurseur de la formation des TG hépatiques.

4.2.3. Les triglycérides hépatiques : point d'arrivée de la lipogenèse

Dans le cytosol, le complexe multienzymatique de l'acide gras synthétase permet de combiner une molécule d'acétyl-CoA avec sept molécules de malonyl-CoA dans le but de synthétiser le premier acide gras saturé à seize carbones (acide palmitique; C16:0). Cette réaction nécessite du NADPH, provenant principalement de la voie des pentoses phosphates. L'acide palmitique peut être encore allongé à l'aide de diverses élongases microsomiales qui ajoutent deux carbones à la fois (provenant du malonyl-CoA) à la chaîne d'acide gras et permet ainsi d'obtenir d'autres acides gras saturés dont les acides stéarique (C18:0) et arachidique (C20:0). Ceux-ci peuvent être désaturés et allongés à nouveau afin de fournir divers acides gras à chaîne longue (163, 164). Ce qui contribue ainsi à augmenter les réserves d'acides gras, en plus des acides gras provenant des lipoprotéines circulantes, suite à l'hydrolyse de leur contenu en TG par la lipase hépatique, ainsi que des acides gras non estérifiés plasmatiques (164, 165).

Ces acides gras servent à fournir de l'énergie par la β -oxydation, à entrer dans la structure des phospholipides, leukotriènes et thromboxanes ou bien, lorsqu'ils sont disponibles en grandes quantités, servent à la synthèse de TG (164). Cette synthèse s'effectue de deux

façons, soit la liaison successive de trois acides gras à une molécule de glycérol ou bien via la liaison d'un acide gras à un diacylglycérol obtenu suite à la déphosphorylation de l'acide phosphatidique (165). Ces TG pourront être hydrolysés pour libérer les acides gras nécessaires aux fonctions préalablement citées, mais surtout, pourront être véhiculés vers les autres tissus via les lipoprotéines.

4.2.4. Les triglycérides plasmatiques en fonction des triglycérides hépatiques

Les TG hépatiques sont véhiculés du foie vers les autres tissus par l'entremise des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) où leur contenu en lipides est constitué de 55 à 80 % de TG (164). La provenance des acides gras entrant dans la composition des TG intégrés dans les VLDL plasmatiques est complexe. Chez des hommes en bonne santé, il s'avère que les VLDL contiennent davantage de TG composés d'acides gras recyclés par le foie, plutôt que d'acides gras nouvellement synthétisés par la lipogenèse (166, 167). Toutefois, chez des hommes souffrant d'obésité, en présence ou non de diabète de type II, on observe une plus grande synthèse de VLDL et les acides gras qui entrent dans la composition de leurs TG proviennent davantage de la lipogenèse comparativement aux niveaux observés chez des hommes en santé (167). Ces maladies métaboliques sont associées à l'accumulation de TG dans le foie. Ainsi, il est possible qu'une hausse de la lipogenèse augmente les niveaux de TG hépatiques et qu'une plus grande partie des TG, composés d'acides gras nouvellement synthétisés, prennent part à la formation des VLDL, ce qui pourrait être impliqué dans la hausse des TG plasmatiques.

5. La théorie de la programmation

La programmation, définie par *Lucas et al.*, est un concept se référant à une insulte ou un stimulus ayant été induit au cours d'une période critique ou sensible de la vie et qui entraînerait des répercussions sur les fonctions ou les structures d'un organisme à long terme, voir parfois durant toute la vie (168). La vie fœtale et néonatale est une période critique où les hormones, les médicaments et la nutrition peuvent influencer le développement et les fonctions de certains organes (169). Les conséquences peuvent être positives ou non et elles seront visibles dès l'induction du stimulus ou plus tard au cours de la vie (169). Actuellement, il n'est pas possible de bien définir l'étendue de la fenêtre (période critique) qui rend l'organisme susceptible à une programmation (169). Il est tout de même de plus en plus reconnu que la nutrition de la mère en période de grossesse, ainsi que la nutrition de l'enfant durant les premiers moments de sa vie influenceront la santé métabolique de ce dernier une fois adulte (25, 168, 169).

Afin de pouvoir expliquer ce phénomène, l'épigénétique s'est introduit dans le concept de programmation. L'épigénétique est tout ce qui permet de contrôler le niveau d'expression des gènes, soit : 1) la méthylation de l'ADN et 2) la méthylation, l'acétylation et la phosphorylation des histones (protéines nécessaires au repliement de l'ADN) (26). Le SAM est essentiel pour fournir des groupements méthyles à l'ADN à l'aide d'enzymes méthyltransférases. Ces méthyles se fixent seulement aux cytosines formant un dinucléotide avec la guanine, appelé îlots CpG, ce qui abaisserait la transcription du gène concerné (26). La moitié des gènes humains contiendrait ces îlots situés dans leur zone régulatrice (7). La vie foetale et néonatale est une période critique aux effets de l'environnement sur les niveaux de méthylation des gènes et le devenir de l'enfant. En effet, le taux de croissance est fulgurante durant cette période et le profil de méthylation de l'ADN est transmis aux cellules filles lors de la prolifération cellulaire et ce, afin de permettre à l'organisme de s'adapter à l'environnement qu'il subit tôt dans la vie (25, 26). Ce qui ne correspondra pas toujours avec l'environnement que cet enfant, et ultimement cet adulte, aura à subir dans le futur, d'où le développement à long terme de complications, notamment au niveau métabolique (25).

6. Stress oxydant néonatal et complications métaboliques à long terme

Comme rapportées dans diverses revues de littérature (168-170), plusieurs études nutritionnelles ont été effectuées durant la vie fœtale et néonatale chez l'animal et l'humain dans le but d'observer les conséquences métaboliques à long terme. Parmi les récentes études de *Lucas et al.*, les bébés prématurés nourris avec le lait maternel, plutôt que le lait commercial enrichi, avaient une tension artérielle plus basse (171), une plus faible résistance à l'insuline (172) et des taux de lipoprotéines de faible densité (LDL) plus bas (173) à l'âge de 13 à 16 ans, démontrant ainsi le possible rôle protecteur du lait maternel contre les maladies cardiovasculaires. L'implication des phénomènes épigénétiques dans ce type de programmation a été très bien élaborée par *Waterland et al.* (170).

Par contre, l'effet d'un stress oxydant néonatal sur les complications métaboliques à long terme est peu connu. Il a été légèrement abordé dans la revue de littérature de *Luo ZC et al.* (174), où le stress oxydant maternel et fœtal était principalement discuté, de même que dans les publications de l'équipe de *Nuyt AM* (175, 176) relatif au développement de l'hypertension artérielle. Il a été précédemment présenté qu'un stress oxydant pourrait influencer le métabolisme énergétique hépatique par la stabilisation du HIF-1 α . Ce stress oxydant serait aussi capable d'influencer la méthylation de l'ADN soit en oxydant directement les guanines de l'ADN (affecterait la méthylation de la cytosine juxtaposée) (177) ou en abaissant les niveaux de SAM disponibles, tel serait le cas lors d'une déplétion du glutathion hépatique (24). D'ailleurs, ce dernier point a déjà été associé à une hypométhylation de l'ADN au foie chez le rat (24). Ainsi, cette hypométhylation de l'ADN serait susceptible de survenir chez les prématurés où leurs niveaux de glutathion sont grandement abaissés, et ce, au moment même où le métabolisme énergétique serait perturbé. D'où la pertinence de déterminer si ces perturbations métaboliques, occasionnées par un stress oxydant néonatal, perdurent dans le temps.

Jusqu'à maintenant, les travaux réalisés par le laboratoire de Dr Jean-Claude Lavoie se sont avérés prometteurs en ce qui concerne cette hypothèse. D'après les récents résumés scientifiques publiés dans le cadre de congrès scientifiques, les cobayes nouveau-nés ayant reçus une NP exposée à la lumière (contenant plus de peroxydes), durant seulement leur première semaine de vie, avaient à 14 semaines une baisse des niveaux de GSH hépatique,

une hausse des TG et cholestérol au foie, une baisse de ces lipides au niveau plasmatique (178, 179), ainsi qu'une hausse de l'activité de l'ACC au foie (lipogenèse) (180). De plus, la NP néonatale, peu importe si les solutions étaient exposées ou non à la lumière, avait causé une hausse des niveaux de HIF-1 α (potentialiserait la glycolyse) et une baisse de l'activité de l'AMPK hépatique (inhiberait moins l'ACC) à 14 semaines de vie, comparativement à un groupe sham qui était opéré et nourri avec une diète standard (181). Ce dernier point voudrait dire deux choses : 1) que même une plus faible quantité de peroxydes retrouvée dans la NP protégée de la lumière peut induire des complications métaboliques à long terme et/ou 2) que d'autres éléments nutritionnels liés à l'administration d'une NP peuvent en être la cause (181). À noter qu'ici, une baisse des niveaux de TG plasmatiques a été observée à 14 semaines de vie, contrairement à une hausse de ces niveaux à 1 semaine de vie chez les cobayes ayant reçu une NP exposée à la lumière (21). Ce qui semble contradictoire à première vue, mais pourrait aussi bien démontrer une évolution différente des paramètres biologiques selon l'âge de l'animal, d'où l'importance de vérifier la présence d'interaction entre l'âge et la diète dans l'analyse de nos résultats.

En regard aux observations que : 1) l'infusion de peroxydes (charge oxydante) tôt dans la vie engendre une déplétion du glutathion hépatique et entraîne des complications métaboliques à long terme et que 2) les prématurés humains ont une baisse importante du glutathion cellulaire (provenant des aspirats) associée à une charge oxydante et/ou à une déficience de leur système de défense antioxydante, il s'avère donc important de déterminer quel serait le rôle d'une défense antioxydante inefficace dans le développement des complications métaboliques à long terme. Mon projet de maîtrise a donc contribué à avancer les connaissances sur ce sujet.

7. Hypothèse et objectif de l'étude

L'hypothèse globale de ces travaux de recherche est qu'un stress oxydant néonatal causé par une défense antioxydante faible viendrait perturber le métabolisme de l'énergie et que ces complications sont maintenues dans le temps par des phénomènes épigénétiques. L'objectif de mon projet de maîtrise était de valider cette hypothèse chez le cobaye, soit en créant un stress oxydant néonatal via une diète néonatale restreinte en nutriments essentiels au maintien de la défense antioxydante et d'étudier les effets au niveau du métabolisme énergétique hépatique à court et à long terme. Ce groupe restreint sera comparé avec des cobayes ayant toujours reçu une diète standard pour cobaye.

La première étape des analyses devrait permettre de valider si la diète néonatale restreinte a permis de créer une condition de stress oxydant en venant affecter les antioxydants ciblés par les restrictions. Ainsi, les concentrations de GSH et de GSSG, l'activité de la GSH-Px et de la GSSG-R, les niveaux de Mn-SOD et de CuZn-SOD, l'activité de la catalase ainsi que les concentrations des vitamines E et C seront analysés dans le foie.

La deuxième étape sera d'analyser les effets sur le métabolisme énergétique hépatique immédiatement après la fin de l'administration de la diète néonatale, soit après la première semaine de vie, de même qu'à plus long terme, soit au début de la maturité sexuelle à 14 semaines de vie. Ainsi, les niveaux de HIF-1 α , les concentrations de pyruvate, l'activité de l'ACC et de l'AMPK et les concentrations des triglycérides au foie seront analysés, de même que la glycémie et les triglycérides plasmatiques.

La troisième et dernière étape sera de cerner la présence de corrélations entre des paramètres de la défense antioxydante et ceux du métabolisme de l'énergie hépatique afin de confirmer le lien existant entre un stress oxydant et des complications du métabolisme de l'énergie. Ainsi, advenant le fait qu'aucune corrélation n'existe entre ces paramètres malgré la présence de complications métaboliques à 14 semaines de vie, un phénomène épigénétique serait alors suspecté.

8. Méthodologie

8.1. Préliminaires à l'étude

Concernant le choix du modèle animal, le cobaye est le meilleur modèle dans le cadre de ce projet puisque, comme l'humain, il ne peut pas synthétiser la vitamine C et doit donc l'obtenir exclusivement par la diète. De plus, le profil lipidique de cette espèce ressemble beaucoup plus à celui de l'humain comparativement aux rongeurs, dont le rat, la souris et le hamster (182), de même en ce qui a trait à la réponse du métabolisme lipidique lors de traitements médicamenteux, hormonaux et nutritionnels (183).

L'âge à partir duquel la diète restreinte a été instaurée et cessée se basait sur les études antérieures, effectuées au laboratoire de Dr Lavoie, avec des cobayes recevant une NP néonatale, et ce, dans le but de pouvoir comparer les résultats obtenus avec ce type de traitement. La diète restreinte a donc été administrée du troisième au septième jour de vie, donc durant 4 jours. À noter que les cobayes de 3 jours de vie ne sont plus en contact avec leur mère et ne reçoivent donc pas de lait maternel en plus de leur diète.

Les nutriments essentiels aux défenses antioxydantes devant être déplétés de la diète restreinte sont les suivants : méthionine, cystéine, sélénium, riboflavine, cuivre, zinc, manganèse, fer, vitamines C et E, ainsi que le β -carotène. J'ai donc fait la recherche d'une compagnie pouvant offrir le type de diète souhaitée et qui devait aussi répondre aux autres besoins nutritionnels du cobaye. Il s'est avéré que la compagnie *Dyets Inc.* (Pennsylvanie, É.U.) pouvait nous fabriquer cette diète synthétique où les détails concernant sa composition sont disponibles à l'**annexe I**. Pour le groupe témoin, des cobayes nouveaux ont reçu une diète standard pour cobaye à base de céréales (*Teklad Global High Fiber Guinea Pig Diet*, Harlan, Canada, **annexe II**) du troisième au septième jour de vie. C'est d'ailleurs cette même diète qui a été administrée aux deux groupes (restreint et témoin) après leur septième jour de vie, et ce, jusqu'à 14 semaines de vie. Il faut noter que la méthionine n'a pas été complètement déplétée de la diète restreinte. La raison vient du fait qu'on ne souhaitait pas inhiber de façon trop importante la synthèse protéique. Nous avons donc établi de façon arbitraire une réduction d'environ 30 % du contenu en méthionine de la diète restreinte.

Finalement, une grille de suivi a été instaurée pour l'observation des signes cliniques de déficiences nutritionnelles pouvant survenir au cours de l'administration de la diète restreinte, et ce, dans le but de veiller au bien-être de l'animal. Ceux-ci ont été établis à partir des symptômes recensés de la littérature (chapitre 3) et ont trait à la prise de poids, la température corporelle au toucher, l'apparence générale de l'animal (poil, museau, gencives, yeux, pattes), la présence de tremblements, paralysie ou difficulté à la marche. À noter qu'aucun symptôme clinique de déficience n'a été noté, sauf en ce qui concerne le gain de poids (ces résultats seront présentés au chapitre 10).

Avant de poursuivre avec le détail des méthodes, il serait bon de préciser que plusieurs abréviations ont été utilisées pour le nom de produits chimiques, de matériels et des techniques couramment employés afin d'alléger la lecture du texte. Ces abréviations sont donc définies ici. BSA: albumine de sérum bovin, C: cobayes ayant été nourris avec la diète standard, DC: cobayes ayant été nourris avec la diète restreinte, DNPH: 2,4-dinitrophénylhydrazine, DTT: dithiothréitol, EDTA: acide éthylène-diamine-tétraacétique, EDTA-Na₂: disodium EDTA, EGTA: acide éthylène-glycol-tétraacétique, HEPES: acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazinéthanesulfonique, HPLC: chromatographie en phase liquide à haute pression, H₃PO₄: acide phosphorique, IgG-HRP: immunoglobuline G couplée au peroxydase du raifort, K₃EDTA: tripotassium acide éthylène-diamine-tétraacétique, Na-déoxycholate: sodium-déoxycholate, Na₂-pyrophosphate: disodium pyrophosphate, NaCl: chlorure de sodium, NaF: fluorure de sodium, NaHCO₃: bicarbonate de sodium, NaOH: hydroxyde de sodium, PBS: tampon phosphate, PMSF: fluorure de phénylméthylsulfonyl, PVDF: polyfluorure de vinylidène, RIPA: tampon d'immunoprécipitation, SDS: sulfatedodécylrique de sodium, SDS-PAGE: électrophorèse de gel de polyacrylamide du SDS, Tris-HCl: hydrochlorure de trishydroxyméthylaminométhane, UV: rayonnement ultraviolet.

8.2. Méthodes présentées dans l'article

L'article a été préalablement soumis au journal scientifique *Diabetes* et ensuite au *Free Radical in Biology and Medicine* suite au premier dépôt de ce manuscrit et avec l'accord des co-auteurs. Il a pour titre *Long-term impact of a deficient neonatal diet to sustain the antioxidant defence on the lipid and glucose metabolism*. Celui-ci est présenté au chapitre 9 sous sa version finale lors du premier dépôt de ce manuscrit. Ma contribution comme premier auteur de cet article est d'environ 70 % et tient compte de mon implication dans les travaux de recherche (80 %), à l'analyse et l'interprétation des données (80 %), ainsi qu'à la rédaction et aux corrections de l'article (45 %). Mon directeur de recherche, Dr Jean-Claude Lavoie a aussi participé à l'analyse et à l'interprétation des données (20 %), ainsi qu'à la rédaction et aux corrections de l'article (45 %). Les autres coauteurs ont participé aux travaux de recherche (20 %), ainsi qu'à la révision de l'article (5 %).

Le dessein expérimental de l'étude, les procédures expérimentales, ainsi que les analyses statistiques utilisées sont présentés dans la section Matériels et Méthodes (*Materials and Methods*) de l'article. Certaines méthodes présentées dans cet article sont brièvement détaillées et font référence à d'autres articles. J'ai donc ajouté dans la section qui suit (8.3), les méthodes détaillées lorsque celles-ci n'avaient été qu'abrégées dans l'article.

D'autres résultats avaient été obtenus au cours de mon projet de maîtrise et n'avaient pas été inclus dans l'article. Les méthodes utilisées pour l'obtention de ces résultats sont présentées dans la seconde section ci-dessous (8.4).

Parmi les méthodes présentées dans l'article, j'ai avant tout effectué la mise au point de la méthode de *western blot* du HIF-1 α qui n'était pas encore complétée dans le laboratoire d'accueil. J'ai préparé tous les échantillons en vue des analyses et effectué la plupart des méthodes expérimentales à l'exception de celles-ci : dosage des vitamines E et C par HPLC (Dr Apollinaire Tsopmo), le *western blot* de la CuZn-SOD et de la Mn-SOD (Nathalie Germain et Léna Potvin, laboratoire Dr Anne-Monique Nuyt), ainsi que le dosage du GSH et GSSG par électrophorèse capillaire (laboratoire d'innovation, Centre de recherche CHU Sainte-Justine). L'assistante de recherche du laboratoire d'accueil (Thérèse Rouleau) avait

effectué le dosage du pyruvate hépatique, ainsi qu'a aidé à la manipulation des animaux et au soutien technique en laboratoire.

8.3. Détails des méthodes abrégées de l'article

Les méthodes abrégées dans l'article sont les suivantes : 1) le dosage des vitamines C et E hépatiques, 2) le dosage des triglycérides plasmatiques et hépatiques, ainsi que 3) l'activité de l'ACC et de l'AMPK hépatiques. Ces méthodes sont détaillées ci-dessous.

Concentrations des vitamines C et E hépatiques – La préparation des échantillons hépatiques et le dosage de la vitamine C ont été effectués entièrement par le Dr Apollinaire Tsopmo de l'Université du Manitoba à Winnipeg. La méthode a été adaptée à partir de celle utilisée par *Omaye et al.* (184) et les seules informations concernant cette méthode sont présentées dans l'article.

En ce qui concerne la vitamine E (185), les échantillons de foie ont été dégelés et homogénéisés dans 1 mL d'une solution d'eau:éthanol (1:1) et mélangés ensuite avec 1 mL d'éthanol et 50 µL d'acétate de rétinol (20 µg/mL) comme standard interne. La phase organique contenant les vitamines liposolubles a été extraite par l'ajout de 3 mL d'hexanes et centrifugée à 1200 x g durant 10 min à 4°C. Le surnageant (phase organique) a été prélevé, séché sous un flux d'azote (bain à 30°C) et entreposé à -80°C jusqu'au dosage par HPLC-UV. Un témoin externe a été congelé à -80°C contenant 50 uL d'acétate de rétinol (20 µg/mL) afin de corriger pour la perte de vitamine lors de l'extraction (en se basant sur le témoin interne des échantillons). Ces extraits lipidiques et le témoin externe ont été envoyés sur glace sèche à Dr Tsopmo pour leur dosage au HPLC-UV. Les échantillons et le témoin externe ont été reconstitués dans 500 uL d'une solution de méthanol:chloroforme (2:1) et 20 uL de chacun d'eux ont été séparés par HPLC à un flux de 1 mL/min avec une phase mobile composé de méthanol à 100% et détectés par UV. Une courbe étalon d' α -tocophérol (1 à 10 µg/mL d'éthanol) a été utilisée pour calculer l'équation permettant d'établir les concentrations correspondant à l'aire obtenue sous le pic de rétention de l' α -tocophérol des échantillons. Les détails concernant la colonne de séparation et l'appareil de détection sont présentés dans l'article.

Concentrations des TG plasmatiques et hépatiques – Le dosage des TG s’est effectué sur 10 uL de plasma et 50 uL d’extrait lipidique du foie (méthode de *Folch*) à l’aide d’une trousse commerciale (Roche Diagnostics). Le principe du test est d’hydrolyser les TG en présence d’une lipoprotéine lipase pour obtenir le glycérol où celui-ci est ensuite oxydé pour former du H₂O₂ nécessaire au développement d’une couleur détectable à 500 nm. Du glycérol a été utilisé pour établir une courbe étalon. La méthode de *Folch* (186) permettant l’extraction des lipides hépatiques est la suivante. Environ 0,3 g de foie a été dégelé sur glace et homogénéisé dans une solution saline (0,9% NaCl). Un dosage protéique a été effectué sur 20 µL de l’homogénat (méthode *Bradford*: réactif BioRad et albumine de sérum bovin pour la courbe étalon) et 100 µL de l’homogénat ont été mélangés à 2 mL de *Folch* (solution de chloroforme:méthanol; 2 :1) et agités 1h à 4°C. Après l’ajout de 400 uL de salin (0,9% NaCl) suivi d’une centrifugation à 3800 x g durant 10 min à 15°C, la phase inférieure (organique) a été prélevée et séchée sous un flux d’azote. Les échantillons ont été reconstitués avec l’ajout de 100 uL de *Folch* et 125 uL d’une solution de Thésit dilué à 20 % dans le chloroforme (g/v). Les échantillons ont été séchés sous un flux d’azote et le culot lipidique a été mis en suspension dans 2 x 625 mL d’eau de qualité nanopure. Le dosage des triglycérides a été effectué sur cette suspension.

Activités de l’ACC et de l’AMPK – La préparation des échantillons et le dosage des activités ont été effectués de la même façon que proposée par le groupe de *Lopaschuk et al.* (187-189) avec quelques modifications (21). Les échantillons de foie ont été dégelés sur glace et homogénéisés dans le tampon A (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM mannitol, 50 mM NaF, 5 mM Na₂-pyrophosphate, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 4 µg/mL inhibiteurs de protéases, 1 mM benzamidine) et centrifugés à 14 000 x g durant 20 min à 4°C. Les surnageants ont été prélevés, amenés à une concentration de 2,5 % en PEG 8000 (en utilisant une solution de 25 % (g/v) de polyéthylène glycol 8000), incubés 10 min sur glace avec agitation et centrifugés à 10 000 x g durant 10 min à 4°C. Les surnageants ont été prélevés, amenés à une concentration de 6 % en PEG 8000 (avec la solution de 25% PEG), incubés 10 min sur glace avec agitation et centrifugés à 10 000 x g durant 10 min à 4°C. Les culots ont été remis en suspension dans 1 mL d’une solution de 6 % PEG 8000, centrifugés à 10 000 x g durant 10 min à 4°C. Les culots ont été remis en suspension dans le tampon B (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaF, 5 mM Na₂-

pyrophosphate, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 10 % glycérol (v/v), 4 µg/mL inhibiteurs de protéases, 1 mM benzamidine, 0,02 % sodium azide (g/v)). Un dosage protéique a été effectué sur 20 µL de cette suspension (méthode *Bradford*) et le reste a été conservé à -80 C jusqu'au dosage.

L'activité de l'ACC a été déterminée de façon radioactive par l'incorporation du carbone radioactif (provenant du ¹⁴C-bicarbonate)   l'acétyl-CoA et de mesurer la radioactivité obtenue provenant du ¹⁴C-malonyl-CoA produit par la réaction. Le milieu réactionnel contenait 145 uL de tampon de réaction complet (60,6 mM Tris acétate pH 7,5, 1 mg/mL BSA, 1,3 uM β-mercaptoéthanol, 5 mM acétate de magnésium, 2,1 mM ATP, 1,1 mM Acétyl-CoA), ainsi que 12,5 uL de tampon de réaction partiel contenant ou non 100 mM de glutamate comme activateur (60,6 mM Tris acétate pH 7,5, 1 mg/mL BSA, 1,3 uM β-mercaptoéthanol, 5 mM acétate de magnésium). Les échantillons ont été dilués dans le tampon partiel (25 µg/5 µL) et 5 µL de cette dilution ont été ajoutés au milieu réactionnel, suivi d'une incubation de 20 min à 37 C. La réaction a été initiée par l'ajout de 18,2 mM (du volume final) de NaHCO₃ (contenant NaH¹⁴CO₃ pour 1000 dpm/nmol) durant 5 min et elle a été arrêtée par l'ajout de 25 uL d'une solution de 10% d'acide perchlorique, suivi d'une incubation sur glace de 15 min et d'une centrifugation à 1000 x g durant 20 min. Les surnageants ont été prélevés, séchés sous une hotte durant la nuit et leur radioactivité a été compt e à l'aide d'une technique utilisant un liquide de scintillation. L'activité de l'ACC a été exprimée en nmole de malonyl-CoA produit/min/mg de protéine.

L'activité de l'AMPK a été déterminée de façon radioactive par l'incorporation du phosphate radioactif (provenant de l'AT³²P)   un peptide synthétique SAM (séquence des acides aminés : HMRSAMSGLHLVKRR) et de mesurer la radioactivité obtenue provenant du produit de la réaction. Le milieu réactionnel a été préparé avec 15 uL de tampon de réaction complet contenant ou non 200 µM AMP comme activateur (40 mM HEPES-NaOH pH 7,0, 80 mM NaCl, 8% glycérol, 0,8 mM EDTA, 0,8 mM DTT, 200 µM SAMS). Ce milieu a été pr incub  5 min à 30 C. La réaction a été initiée par l'ajout de 200 µM (du volume final) d'ATP (contenant AT³²P pour 500 dpm/pmol) durant 5 min. Elle a été arrêtée par le prélèvement de 15 uL du milieu qui a été appliqué sur du papier de phosphocellulose de 1 cm² (P81, Whatman). Ces papiers ont été séchés 1h, transférés dans des flacons à

scintillation, lavés 4 x 20 min avec une solution de 150 mM H₃PO₄ et 1 x 20 min avec de l'acétone. Les papiers ont été séchés sous une hotte durant la nuit et leur radioactivité a été comptée à l'aide d'une technique utilisant un liquide de scintillation. L'activité de l'AMPK a été exprimée en nmole ³²P incorporé dans le peptide SAMS/min/mg protéine.

8.4. Autres méthodes non insérées dans l'article

Les autres méthodes utilisées au cours de ce projet, où les résultats étaient pertinents, mais non insérés dans l'article, sont les suivantes : 1) le relevé des apports nutritionnels moyens en énergie, macronutriments et méthionine durant la 1^{re} semaine de vie et 2) le dosage des concentrations de pyruvate hépatique.

À noter que le dosage de la catalase hépatique n'est pas présenté dans ce mémoire puisque le dosage a été effectué avec la fraction cytosolique des cellules hépatiques et non pas avec la fraction peroxysomiale, là où l'enzyme est davantage présente. De plus, quelques essais avaient été effectués pour le dosage de l'activité de la CuZn-SOD et la Mn-SOD, mais certaines mises au point devaient encore être effectuées. Les niveaux de protéines de chaque SOD, évalués par *western blot*, ont plutôt été analysés et présentés dans ce projet.

Relevé des apports nutritionnels moyens en énergie et macronutriments - Afin de s'assurer que les apports en énergie et en macronutriments étaient équivalents entre les groupes sous diète restreinte et contrôle, on a calculé la quantité de diète qui avait été consommée pour chaque animal durant 24 heures, et ce, pour les 2 derniers jours de la période test qui était de 4 jours, donc pour les jours 3 et 4. Les apports moyens en énergie, protéines, méthionine, lipides et glucides ont été calculés et exprimés par 100 g de poids corporel/jour, soit le poids corporel moyen des deux jours utilisés pour le relevé des apports. Les apports des cobayes sous diète contrôle devant être suivis jusqu'à 14 semaines de vie n'avaient pas pu être prélevés au cours de ce projet. L'analyse des apports sera donc effectuée entre les animaux contrôles et restreints du groupe de 1 semaine de vie seulement.

Concentrations de pyruvate hépatique - Les échantillons de foie ont été dégelés sur glace et homogénéisés dans un tampon fourni par une trousse commerciale qui permet de doser le pyruvate via une réaction enzymatique colorimétrique. Les protéines ont été dosées par la

méthode *Bradford* en utilisant l'albumine de sérum bovin pour la courbe étalon. Les concentrations ont été exprimées en nmole pyruvate/mg de protéine.

9. Article soumis au journal scientifique *Diabetes*

La version finale de l'article au moment du premier dépôt de ce manuscrit est présentée dans ce chapitre. Cet article a été soumis par la suite au journal scientifique *Free radical in Biology and Medicine* après le premier dépôt du manuscrit et avec l'accord des co-auteurs. Veuillez prendre note que les sources documentaires de cet article sont indépendantes de celles du mémoire et elles sont citées à la fin de ce manuscrit.

LONG-TERM IMPACT OF A DEFICIENT NEONATAL DIET TO SUSTAIN THE ANTIOXIDANT DEFENCE ON THE LIPID AND GLUCOSE METABOLISM

Valérie Turcot¹, Thérèse Rouleau^{1,2}, Apollinaire Tsopmo³, Nathalie Germain², Léna Potvin², Anne-Monique Nuyt², *Jean-Claude Lavoie^{1,2}

¹ Departments of Nutrition, ²Paediatrics, CHU Sainte-Justine, Faculty of medicine, University of Montréal, Montréal, Qc, Canada H3T 1C5; ³ Department of Human Nutritional Sciences and Paediatrics, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada R3T 2N2

Corresponding author:

*Jean-Claude Lavoie

Research Centre,

CHU Sainte-Justine

3175 Chemin de la Côte Ste-Catherine

Montreal, Qc, CANADA H3T 1C5

Phone: 514 345 4931 ext 3940 / Fax: 514 345 4801

E-mail: jean-claude.lavoie@recherche-ste-justine.qc.ca

Abstract

Objective: Preterm infants are faced to oxidative stress, which is suspected to induce metabolic syndrome. The oxidative stress is generated by a low antioxidant defence and/or high oxidant load. Hypothesis: a weak antioxidant defence early in life such as observed in preterm newborns is sufficient to induce metabolic syndrome later in the life.

Research Design and Methods: Four groups of guinea pigs (n=21) received between their 3rd and 7th days of life regular chow (groups: C-1wk and C-14wk) or antioxidant deficient chow (groups: DC-1wk and DC-14wk). At 7-day old, 1wk-groups were sacrificed for plasma and liver sampling whereas 14wk-groups were fed with regular chow until 14 weeks. Blood glucose and plasma triacylglycerol were determined at 1-, 3-, 11- and 13- or 14-week old. Glucose tolerance test was performed at 13 weeks. Hepatic antioxidant defences and key proteins regulating lipid and glucose metabolism were measured at 1 and 14 weeks.

Results: The oxidized redox status of glutathione associated with the neonatal deficient diet was maintained until at least 14 weeks of life ($p<0.01$). The low plasma triacylglycerol, low blood glucose and better tolerance to glucose at 14 weeks ($p<0.05$) are surprisingly associated with an oxidized redox status.

Conclusions: The low glutathione levels observed in newborn preterm infants has been reproduced in our animal model. Since the cellular redox environment is an important rheostat of the metabolism influencing development, results suggest being careful before adopting aggressive antioxidant therapeutic measures leading to a “reductive stress”.

Introduction

The oxidative stress can be defined as being a breaking of homeostasis between oxidant challenge and antioxidant defenses in favor of oxidants. Preterm infants are subject to oxidative stress because their antioxidant defenses are weak and oxidant loads are heavy. The low antioxidant defenses of preterm infants are explained by 1) low activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) or glutathione peroxidase (1), 2) low glutathione level (2, 3) and cellular uptake of cysteine (4), a limiting step in glutathione synthesis, 3) and low concentration of exogenous free radical scavengers such as vitamin C and E (5, 6). On the other side, the main oxidant sources are oxygen therapy and peroxides deriving from parenteral nutrition (7). Neonatal oxidant loads are associated with pathological complications in liver (8, 9), lungs (10, 11) and brain (12, 13). Some of these injuries will become chronic and will persist during all the life.

Recently, the neonatal oxidative stress has been suspected to induce the development of the metabolic syndrome observed in adult (14, 15). A disorder of energy metabolism seems to be an important cause of this syndrome. The main carbon sources for ATP production are glucose and fatty acids. Glycolysis pathway generates ATP during transformation of glucose in pyruvate, which can be subsequently transformed in acetyl-CoA in mitochondrion. By its incorporation into the Krebs cycle, acetyl-CoA takes part in an additional production of ATP. Acetyl-CoA is also produced by the mitochondrial β -oxidation of fatty acids. A greater glycolysis rate, such as induced by an elevated concentration of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 α (16, 17), produces a higher amount of acetyl-CoA which may be used for lipogenesis. This situation may lead to a rise of triacylglycerol concentration in plasma, a characteristic feature of metabolic syndrome. However, the lipogenesis is also under the control of AMP-activated protein kinase (AMPK) (18, 19). By phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase (ACC), an essential step for fatty acid synthesis, AMPK is reported to inhibit lipogenesis. Since AMPK is activated by a high ratio AMP/ATP, the high ATP production from a stimulated glycolysis rate may prevent the activation of AMPK. Therefore, an activated ACC combined with higher substrate availability, deriving from stimulated glycolysis, can lead to a rise of the plasma concentration of triacylglycerol.

We hypothesize that a neonatal oxidative stress caused by low antioxidant defenses, such as observed in premature newborn infants, without external oxidant challenges, participates in the development of the metabolic syndrome. The purpose of the present study was to investigate in an animal model the long term impact of a neonatal diet deficient in essential nutrients for antioxidant defenses on blood glucose and plasma triacylglycerol as well as hepatic HIF-1 α level, AMPK and ACC activities.

Materials and Methods

Experimental design

To assess the short- and long-term effect of neonatal diets, four groups of 3-day old Hartley guinea pig pups (Charles River, St. Constant, Canada) (N = 21) were fed as followed:

- 1) C-1wk: animals fed during 4 days with regular chow diet for guinea pigs (2041-Teklad Global High Fiber Guinea Pig Diet, Harlan, Canada), and sacrificed at 1-week old.
- 2) DC-1wk: animals fed during 4 days with deficient chow diet (556254-Custom Guinea Pig Diet, Dyets Inc., Pennsylvania, U.S.), and sacrificed at 1-week old.
- 3) C-14wk: animals fed with regular chow diet, and sacrificed at 14-week old.
- 4) DC-14wk: animals fed during 4 days with deficient chow followed by regular chow diet for guinea pigs until 14-week old, time of sacrifice.

Animals had free access to chow and water. They were housed in animal facility with constant temperature and 12/12hr light/dark cycle. Diet intake and body weight were noted daily for each group during the first 4 days of treatment. Blood samplings from saphenous vein were performed at 1-, 3-, 11- and 13- or 14-week old, after a 12hr fasting period, for blood glucose and plasma triacylglycerol determinations. At 13-week old, glucose tolerance test was assessed after 12hr fasting period. At one or 14-week old, animals were sacrificed under anaesthesia with ketamine/xylazine followed by cardiac puncture. Blood was collected in K₃EDTA-coated tubes. After centrifugation, plasma was stored at -80°C whereas red blood cells were treated for glutathione determination (see below). The liver was removed, rinsed in 0.9% NaCl and separated in 3 fractions: i) treated for glutathione determination, ii) treated for HIF-1 α determination (see below) and iii) the rest was rapidly minced, aliquot and stored at -80°C. This study was approved by the Institutional Review

Board for the care and handling of animals, in accordance with guidelines of the Canadian Council of Animal Care.

Diet descriptions

The control chow guinea pig diet (C) was provided in pellets and composed of alfalfa/cereals base with added vitamins and minerals to cover guinea pig requirements. The deficient chow guinea pig diet (DC) was a synthetic diet, in pellets form, that covers guinea pig requirements except for nutrients to be depleted (**Table 1**). The L-amino acids were balanced with glutamic acid to be compared to the control chow diet and stripped corn oil was used to minimize the addition of α -tocopherol in the DC diet. Table 1 compares the energy, macronutrients and targeted micronutrients of both diets.

Analytical procedures

Vitamin C and E concentrations – Vitamin C determination was according to the method of Omaye *et al.* (20). Total ascorbic acid (ascorbic + dehydroascorbic acid) in tissue was oxidized with 2,4-DNPH and quantified at 520 nm. Vitamin E (α -tocopherol) was separated by HPLC (Waters Spherisorb ODS2 5 μ m (250 x 4.6 mm) reverse phase C₁₈ column, using 1 ml/min methanol as the mobile phase and detected at 292 nm as previously reported (21).

MnSOD and CuZnSOD Western blots – As previously reported (22), protein from liver were extracted with RIPA buffer and 5 μ g proteins were separated on SDS-PAGE, electroblotted onto a PVDF membrane (Bio-Rad Lab. Hercules, CA) and incubated with rabbit polyclonal anti-CuZnSOD or rabbit polyclonal anti-MnSOD (Stressgen, Cedarlane Labs, ON, Canada) (1:10 000), and mouse monoclonal anti- β -actin (Novus Biological, Cedarlane Labs) (1:5000). IgG-HRP secondary antibody (Amersham, GE Healthcare, UK) (1:7500) was used for the detection of bands by chemiluminescence (ECL+, Amersham) on X-ray film (Bioflex Econo, Interscience, Markham, ON, Canada). Results were quantified by densitometry (Fluor Chem 8800 Imaging System, Alpha Innotech Corporation).

GSH and GSSG concentrations – As previously reported (23), immediately after their collection, 150 μ l of red blood cells and 0.5 g of liver were homogenized in 5% (w/v) iced

metaphosphoric acid and centrifuged 3-min at 7800 x g. Supernatant and pellet were separated and frozen at -80°C until glutathione and protein determinations respectively. Reduced (GSH) and disulfide (GSSG) form of glutathione were separated by capillary (75 µm x 50 cm silica) electrophoresis (75 mM boric acid + 25 mM bis-Tris, pH 8.4; 28°C; 18 kV) and detected at 200 nm on P/ACE MDQ system (Beckman Coulter). GSH and GSSG were used as external standard curves. The redox potential was calculated from the Nernst equation (25°C; pH 7.0) (24).

Glutathione reductase (GSSG-R) and peroxidase (GSH-Px) activities – Liver was homogenized in 9 vol of TE buffer (50mM Tris, 0.1 mM EDTA-Na₂, pH 7.6) and centrifuged at 7800 x g, 1-min. For GSSG-R (25, 26): supernatant was mixed in TE buffer containing 0.1 mM NADPH and 1 mM GSSG (Roche Diagnostics) in 1 ml total volume. For GSH-Px (27): supernatant was mixed in TE buffer containing 1 mM GSH, 1 mM t-butylhydroperoxide (Sigma-Aldrich Canada Ltd., ON, Canada), 0.1 mM NADPH and 5 µg GSSG-R (120U/mg; Roche Diagnostics) in 1 ml total volume. The disappearance of NADPH ($6.22 \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) recorded at 340 nm was used to calculate enzyme activities (nmol/min/mg protein).

Blood glucose and Glucose tolerance test (GTT) – Blood glucose was measured with OneTouch Ultra glucometer (Johnson & Johnson). GTT: 2 ml of 50 % dextrose solution / kg body weight were intraperitoneally injected. Blood glucose was determined before and at every 30 min after the injection until 150 min.

Triacylglycerol – The assay using an enzymatic colorimetric test (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) was performed on plasma and liver samples after a Folch extraction (28).

HIF-1α Western blot – Immediately after sampling, 200 mg of liver were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until determinations. Sample was thawed on ice, homogenized in iced-cold buffer A (320 mM sucrose, 4 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 200 µM desferoxamine (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml PMSF (Sigma-Aldrich), protease inhibitor cocktail (1 complete mini-tablet/25 ml, Roche Diagnostics) and centrifuged (600 x g, 10-min, 4°C). Nuclei fraction (pellet) was suspended in buffer A and centrifuged. Pellet was

washed in ice-cold PBS containing 200 μ M deferoxamine + protease inhibitor cocktail and centrifuged. The pellet was suspended in iced buffer B (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% Na-deoxycholate, 0.1 % Triton X-100, 0.1 % SDS, 13 mM Na_3VO_4 , 200 μ M deferoxamine (all from Sigma-Aldrich) and protease inhibitor cocktail agitated 1hr, 4°C and stored at -80°C until Western blotting. One hundred μ g of proteins were separated on SDS-PAGE at 100 V, 2hr and electroblotted onto PVDF membrane 2hr, 90 V, 4°C. After blocking nonspecific binding, membranes were incubated overnight with mouse anti-human HIF-1 α (BD BioSciences, ON, Canada) (1:500) and a mouse anti-human tubuline- α (US Biological, Cedarlane Labs) (1:500) at 4°C. Membranes were washed, incubated 1hr with a goat anti-mouse IgG-HRP secondary antibody (R&D Systems, Cedarlane Labs) (1:500), washed (4 x 15-min) and revealed by chemiluminescence (25% SuperSignal West Femto : 75% SuperSignal West Pico, Pierce Biotechnology Inc, Illinois) on X-ray film. Bands were quantified by densitometry (Fluor Chem 8800 Imaging System).

AMPK and ACC activities – ACC and AMPK activities was measured from liver extracts, 6% PEG 8000 (Sigma-Aldrich) fraction, as previously reported (29, 30 31). AMPK activity determination was based on the incorporation of ^{32}P (from AT^{32}P , 3 Ci/mmol, Amersham) into synthetic SAMS peptide (HMRSAMSGHLHLVKRR) (Synthèse de peptide de L'Est du Québec, Quebec City, Canada). The activity was expressed as nmol ^{32}P incorporated into SAMS/min/mg protein. Because AMPK activity is AMP-sensitive, the assay was performed after 15-min pre-incubation at 30°C with or without 200 μ M 5'-AMP (Sigma-Aldrich). ACC activity determination was based on the ^{14}C -bicarbonate ($\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, 14 mCi/mmol, Sigma-Aldrich) fixation and was expressed as nmol malonyl-CoA produced/min/mg protein. Since glutamate favours the activation of the enzyme (32, 33) the assay was performed after a 20-min pre-incubation at 30°C with or without 7.5 mM glutamate.

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm sem and compared by factorial ANOVA. All comparisons were orthogonal. Significant interaction between age and diet led us to compare the diet effect for each age. If necessary, natural logarithm transformation was

used to meet the homoscedasticity (Bartlett's χ^2 test) condition. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

Body weight (97 ± 2 g) at the initiation of the protocol (3-day old) did not vary between groups ($F_{(1,17)} < 1.4$). At 1- as well as at 14-week old, body weights were similar between DC and C groups (1 wk: 105 ± 3 vs. 112 ± 4 g; 14 wk: 755 ± 23 vs. 754 ± 16 g, respectively).

Antioxidant defenses

The interaction between diet and age was significant for hepatic vitamin C ($F_{(1,17)} = 28.1$, $p < 0.01$) but not for vitamin E ($F_{(1,17)} = 1.9$) (**Table 2**). At 1-week old, vitamin C level was lower ($F_{(1,17)} = 33.8$, $p < 0.01$) in DC group whereas at 14-week old, concentrations were similar ($F_{(1,17)} = 2.8$). Vitamin E concentrations were not influenced by the diet ($F_{(1,17)} = 0.02$), but they were lower at 14-week old ($F_{(1,17)} = 9.9$, $p < 0.01$).

The interaction between diet and age was significant for hepatic CuZnSOD ($F_{(1,17)} = 5.6$, $p < 0.05$) but not for MnSOD ($F_{(1,17)} = 0.05$) (**Table 2**). The protein level of CuZnSOD was higher in the 1-week old group fed with DC ($F_{(1,17)} = 5.4$, $p < 0.05$) and was similar to C group at 14-week old ($F_{(1,17)} = 1.0$). The level of MnSOD was not influenced by diet ($F_{(1,17)} = 0.6$) but it was higher at 14-week old ($F_{(1,17)} = 16.0$, $p < 0.01$).

The hepatic redox potential (**Figure 1A**) was higher (more oxidized) in groups fed with DC ($F_{(1,16)} = 13.1$, $p < 0.01$) independently of the age (no interaction; $F_{(1,16)} = 0.1$) and without age effect ($F_{(1,16)} = 0.2$). Whereas in erythrocytes (**Figure 1B**), the redox potential was higher in DC groups ($F_{(1,17)} = 5.8$, $p < 0.01$) and in younger animals ($F_{(1,17)} = 47.0$, $p < 0.01$) without interaction ($F_{(1,17)} = 0.4$). In liver, the modification in redox potential was explained by a lower GSH level in DC groups ($F_{(1,16)} = 37.1$, $p < 0.01$) whatever the age (**Table 3**). The GSH concentration was higher ($F_{(1,16)} = 28.2$, $p < 0.01$) at 14-week old for both diets and there was no interaction between age and diet ($F_{(1,16)} = 2.1$). In contrast, the significant interaction between diet and age ($F_{(1,16)} = 15.1$, $p < 0.01$) sustains that the DC diet affected liver GSSG only at 1-week old ($F_{(1,16)} = 18.6$, $p < 0.01$). In erythrocytes, the modification of redox

potential related to the age was explained by a lower GSH (**Table 3**) in the youngest animals ($F_{(1,16)}=34.8; p<0.01$).

DC has induced a permanent enhancement of glutathione reductase activity (**Table 3**) ($F_{(1,17)}=6.2, p<0.05$), independently of age (no interaction ($F_{(1,17)}=0.3$)) and without age effect ($F_{(1,17)}=2.0$). Whereas glutathione peroxidase activity (**Table 3**) was higher at 14-week old ($F_{(1,17)}=10.1, p<0.01$) independently of diet (no interaction ($F_{(1,17)}=0.9$)) and without diet effect ($F_{(1,17)}=2.5$).

Energy metabolism

The significant interaction ($F_{(1,39)}=6.1, p<0.05$) between diet and age on blood glucose (**Figure 2A**) allowed us analyze the effect of neonatal diet for each age. DC groups had the lowest blood glucose values at 11- and 13-week old ($F_{(1,39)}>4.2, p<0.05$) but not at 1 and 3 weeks ($F_{(1,39)}<1.6$). Results from glucose tolerance tests (**Figure 2B**) show a lower blood glucose in DC group at 60 and 90 minutes post injection ($F_{(1,54)}>8.1, p<0.01$).

Similarly to blood glucose, **figure 3** shows the interaction between diet and age ($F_{(1,38)}=6.6, p<0.05$) for plasma TG concentrations. There was no effect of diet at 1-week old ($F_{(1,38)}=0.6$) whereas the group who received DC during their first week of age had lower TG concentrations at 3-, 11- and 14-week old ($F_{(1,38)}>6.0, p<0.05$). Hepatic TG levels were not affected ($F_{(1,17)}<3.7$) by diet or age (C-1wk: 243 ± 34 ; DC-1wk: 143 ± 26 ; C-14wks: 156 ± 46 ; DC-14wks: 130 ± 20 μM).

The increased TG value in plasma was assessed to be caused by a greater availability of substrate for lipogenesis following a stimulated glycolysis rate and/or by an increasing activity of ACC, a key enzyme of lipogenesis. HIF-1 α regulates positively the glycolysis rate (16, 17). The significant interaction ($F_{(1,16)}=17.8, p<0.01$) between diet and age for HIF-1 α level (**Figure 4A**) underlines that the neonatal DC diet had a positive effect only at 1-week old ($F_{(1,16)}=25.3, p<0.01$) and not at 14-week old ($F_{(1,16)}=0.9$). The high HIF-1 α level may be explained by a greater stability of the protein in condition of low vitamin C availability as observed here (**Table 2**); vitamin C is required for its degradation (34). The correlation between HIF-1 α (expressed as relative unit; RU) and vitamin C (mg vit /g of

wet tissue) was statistically significant: $y = -2.4 \text{ RU}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{x} + 1.6 \text{ RU}$, $n=21$; $r^2=0.30$, $p<0.01$). HIF-1 α did not explain the variation of TG in plasma ($r^2=0.01$), data not shown.

The activity of ACC (**Figure 4D**) was lower in DC group at 14-week old ($F_{(1,17)}=31.0$, $p<0.01$) but not at 1-week old ($F_{(1,17)}=0.02$); the interaction was significant ($F_{(1,17)}=16.3$, $p<0.01$). The activity of this enzyme is influenced by its phosphorylation state, inhibited in phosphorylated state. The addition of glutamate in homogenate before the activity assay stimulates the endogenous phosphatase PP2A (32, 33), revealing the total ACC activity. Since the same interaction ($F_{(1,17)}=24.0$, $p<0.01$) and the same diet effect at 14-week old ($F_{(1,17)}=72.5$, $p<0.01$) occurred in the presence of glutamate (**Figure 4E**), the differences in ACC activities observed here (**Figure 4D**) seems to be caused by a modification at the protein level rather than a difference in the phosphorylation state. The correlation between ACC activity and TG in plasma was positive ($y = 21 \mu\text{M}\cdot\text{U}^{-1}\cdot\text{x} + 422 \mu\text{M}$, $n=21$; $r^2=0.31$, $p<0.01$).

There was no significant interaction between age and diet for AMPK activity ($F_{(1,17)}=2.7$) (**Figure 4B**). The activity was lower in DC groups ($F_{(1,17)}=6.5$, $p<0.05$) and higher in older animals ($F_{(1,17)}=5.9$, $p<0.05$). This variation in AMPK activity seems to be related to its phosphorylation state as suggested by the absence of difference ($F_{(1,17)}<1.8$) between groups when AMP was added to the assay (**Figure 4C**); AMP leads to the activation of AMPK by phosphorylation.

Although the activity of ACC is reported to be negatively regulated by AMPK (34), the positive correlation between them ($r^2=0.63$, $p<0.01$, data not shown) suggests that these two enzymes did not communicate together in our experimental condition. On the other hand, the significant and positive correlation between AMPK activity (U: nmol/min/mg prot) and plasma TG concentrations ($y = 69 \mu\text{M}\cdot\text{U}^{-1}\cdot\text{x} + 348 \mu\text{M}$, $n=21$; $r^2=0.35$, $p<0.01$) supports the fact that, in our conditions, AMPK did not inhibit ACC activity. The positive effect of AMPK on TG may be explained by its reported positive effect on glycolysis rate to produce ATP (35, 36), and consequently to bring substrate (acetylCoA) to the stimulated ACC. Hence, plasma TG was explained at 31% by ACC activity ($r^2=0.31$) and at 35% by AMPK activity.

Redox potential of glutathione and biochemical parameters

The hepatic redox potential had different effects on blood glucose, ACC or AMPK activities according to the age of the animal. Indeed, the correlations between hepatic redox potential and these parameters did not reach the statistical significance at 1-week old ($r^2 < 0.27$), whereas they were negative at 14-week old ($r^2 > 0.47$, $p < 0.01$) (**Figure 5**). The negative correlation between the redox potential in erythrocytes and blood glucose also reached significance: $r^2 = 0.44$, $p < 0.01$ (**Figure 5B**).

Discussion

Their frail antioxidant defenses predispose preterm infants to pathological complications associated with oxidative stress. One purpose of the present study was to recreate this redox condition by diminishing the antioxidant defense in a newborn animal model. The deficient diet received during the first week of life has led to a lower glutathione content in liver and consequently to a more oxidized redox status. We have previously demonstrated that glutathione is low in premature infants (3). Thus, our experimental model was close to a clinical situation. Because the hypothesis of an association between a perinatal oxidative stress and metabolic syndrome later in life, the second purpose of the study was to assess the long-term impact of a low neonatal antioxidant defenses. The main findings are that 1) the oxidized redox status of glutathione associated with the neonatal deficient diet was maintained until at least 14 weeks of life, and 2) the low plasma triacylglycerol, low blood glucose and better tolerance to glucose at 14 weeks of age are associated with an oxidized redox status, which is surprising compared to previous hypotheses.

The modification of redox potential is explained by the low glutathione level induced by the diet deficient in methionine and cysteine, which is the limiting substrate for glutathione synthesis. However, the persistence of this disturbance until 14 weeks remains without explanation. An epigenetic phenomenon cannot be excluded. Further study will investigate this hypothesis. At one-week old, immediately after feeding with deficient diet, other antioxidant components were also perturbed without long-term effect. That is the case of vitamin C where the hepatic concentration was the half of the concentration measured in animal on regular chow whereas CuZnSOD was 30% higher. The low vitamin C explained, at least in part, the higher level of HIF-1 α . Although that the effect of HIF-1 α was not

associated with parameters measured here, it was not excluded that such high concentration of HIF-1 α affects other metabolic pathways such as those involved in angiogenesis. The higher activity of glutathione reductase at 1- and 14-week old in animals who received the neonatal deficient diet may be explained by the oxidized redox environment which is needed for its activity (38, 39).

The factorial ANOVA of blood glucose and plasma triacylglycerol revealed a significant interaction between diet and age allowing us to compare separately the effect of age or diet. Because the aim of the study was to compare the effect of diet, analyzes were performed to compare this effect for each week. However, the comparisons between ages for each diet bring other information that was not presented in the results, but will be shortly discussed here. Globally, the concentrations of plasma triacylglycerol as well as blood glucose are rising in function of age in control group (regular chow) whereas they remain constant in animal having an oxidized redox status. Indeed, the age had a significant effect ($F_{(3,38)} > 3.1$, $p < 0.05$) on plasma triacylglycerol (TG) and blood glucose, but with different mean slopes: TG from regular chow group: 25 $\mu\text{M}/\text{wk}$, TG from deficient chow group: -1 $\mu\text{M}/\text{wk}$; blood glucose from regular chow group: 0.11 mM/wk , blood glucose from deficient chow group: 0.01 mM/wk . Hence, an oxidized redox potential of glutathione seemed to protect against the progressive installation of characteristic features of metabolic syndrome. This protection is supported by the better score of the oxidized group to the glucose tolerance test. Unfortunately, the concentration of insulin was not determined because the commercial anti-body against guinea pig insulin is not available. At 14-week old, the maintenance of a lower AMPK activity (providing substrate for lipid synthesis), as well as ACC activity (limiting enzyme for lipogenesis) in deficient chow group, can explain the stability of TG concentration in plasma compared to the enhancement observed in control group. The significant correlations between the hepatic redox potential and these parameters (blood glucose, ACC and AMPK activities) observed only at 14 weeks support the fact that the modification of energy metabolism was time-dependent.

The significant effect of redox potential on these parameters suggests that it could be a common event leading to these metabolic modifications. One key element could be the activity of the phosphatase PTP-1B. Its activity is well known to be regulated by the redox

environment (40, 41, 42, 43, 44). By regulating the phosphorylation state of the insulin receptor, PTP-1B influences the efficiency of the insulin. The inhibition of the activity of the enzyme by oxidation of critical cysteinyl residue (43) by an oxidized environment, or invalidation of this phosphatase in cells and mouse (40, 41, 42, 45), increase the insulin sensitivity. That is in accordance with the improved glucose tolerance test observed in group having more oxidized redox potential. Better insulin sensitivity means lower blood glucose, lower blood insulin and consequently lower ACC activity (46). In the present study, the modulation of ACC activity is link to its concentration rather than its phosphorylation state, supporting the insulin effect on the enzyme (47). The first synthetic product of ACC is malonylCoA which limits the transfer of fatty acids in mitochondrion (48) for their β -oxidation and, consequently limiting ATP production. A low ACC activity allows the lifting of inhibition on this transport and supports the production of ATP. High ATP production decreases the ratio AMP / ATP, limiting the activation of AMPK (37, 48). AMPK is well known to stimulate glycolysis for ATP production and to inhibit ACC activity in order to favor mitochondrial ATP synthesis from fatty acids. Here, the activity of this kinase seems to be associated with a control on glycolysis rather than a modulation on ACC activity. In the circumstance of low ACC activity following a low blood insulin, ATP deriving from mitochondrial β -oxidation of fatty acids prevents the activation of AMPK and consequently limiting the availability of the substrate for lipid synthesis by ACC.

All together, results suggest that a diet inducing a low hepatic glutathione level early in life influences the metabolism of glutathione in a way such as the oxidized redox potential becomes permanent, and that such moderated oxidized redox potential prevents the development of insulin resistance later in the life. In view that low glutathione level in neonatal period is a common denominator of newborn infants, especially of preterm newborns (2, 3), results from our experimental model suggest being careful before adopting aggressive antioxidant therapeutic measures leading to a “reductive stress”. The cellular redox environment is an important rheostat of the metabolism (49) which influences the epigenetic modulation of development (50). The similitude of correlations between blood glucose and redox potential measured in liver as well as in red blood cells opens the opportunity to monitor in newborn preterm infants the development of metabolic syndrome.

Acknowledgement

This work was supported by grant (MOP 77637) and studentship (GCM84896) from the Canadian Institutes of Health Research.

Table 1: Comparison between control chow diet (C) and deficient chow diet (DC)

Diets	Control chow diet (C)	Deficient chow diet (DC)	Antioxidants concerned
Nutrients	Per kg of diet	Per kg of diet	
Energy ¹ (kcal)	2500	3500	
Carbohydrates ² (g)	369 (56% of energy)	488 (53% of energy)	
Fibres (g)	150	150	
Lipids (g)	45 (16% of energy)	100 (26% of energy)	
Amino acids (g)	183 (28% of energy)	183 (21% of energy)	
Methionine (g)	2.9	2.0	Glutathione
Cyst(e)ine (g)	2.7	-	Glutathione
Zinc (g)	86	-	CuZnSOD
Manganese (g)	134	-	MnSOD
Copper (g)	18	-	CuZnSOD
Iron (g)	265	-	Catalase
Selenium (g)	0.21	-	Glutathione peroxidase
Riboflavin (g)	94	-	Glutathione reductase
Vitamin E (g)	100	-	Vitamin E
Vitamin C (g)	13.8	-	Vitamin C
β -carotene (g)	46	-	β -carotene

The table shows the comparison between both diets for energy, macronutrients and essential micronutrients for antioxidant defence. ¹Energy was calculated via the carbohydrates (3.8 kcal/g), amino acids (4 kcal/g) and lipids (9 kcal/g) from the diets. ²The carbohydrates excluded fibres. SOD: superoxide dismutase.

Table 2: Liver vitamin C, vitamin E, CuZnSOD and MnSOD

Groups	1-week old C	1-week old DC	14-week old C	14-week old DC
Vit C (ug/g liver)	312 ± 42	145 ± 20 ††	223 ± 23	271 ± 12
Vit E (ug/g liver)	20.9 ± 2.4	24.0 ± 2.4	17.5 ± 1.7 ††	15.0 ± 1.4 ††
CuZnSOD (relative to β-actin)	0.54 ± 0.07	0.70 ± 0.02 †	0.40 ± 0.06	0.33 ± 0.03
MnSOD (relative to β-actin)	0.65 ± 0.04	0.57 ± 0.05	0.95 ± 0.08 ††	0.91 ± 0.08 ††

C: animals fed with control chow diet during their first week of age; DC: animals fed with deficient chow diet during their first week of age; SOD: superoxide dismutase. In liver, guinea pigs who received the DC diet had lower vitamin C (††: $p < 0.01$) and higher CuZnSOD (†: $p < 0.05$) concentrations at 1-week old. At 14-week old, vitamin E was lower (††: $p < 0.01$) whereas MnSOD was higher (††: $p < 0.01$) compared to 1-week old, for both diet. Means ± s.e.m., n= 4-8.

Table 3: Glutathione concentrations in liver and erythrocytes, glutathione reductase and peroxidase activities in liver

	1-week old C	1-week old DC	14-week old C	14-week old DC
In liver				
GSH (nmol/mg prot.)	39.6 ± 3.4	19.2 ± 5.2 **	49.9 ± 1.9 ‡	37.5 ± 2.3 **‡
GSSG (nmol/mg prot.)	0.59 ± 0.04	0.23 ± 0.05 ††	1.06 ± 0.04	1.16 ± 0.06
GSSG-R act. (nmol/min/mg)	4.6 ± 0.1	5.3 ± 0.2 *	4.4 ± 0.3	4.9 ± 0.2 *
GSH-Px act. (nmol/min/mg)	7.1 ± 0.5	7.4 ± 0.3	8.2 ± 0.6 ‡‡	9.3 ± 0.3 ‡‡
In erythrocytes				
GSH (nmol/mg prot.)	3.1 ± 0.8	2.4 ± 0.3	7.9 ± 1.1 ‡‡	6.2 ± 0.4 ‡‡
GSSG (nmol/mg prot.)	0.27 ± 0.06	0.30 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.37 ± 0.13

C: animals fed with control chow diet during their first week of age; DC: animals fed with deficient chow diet during their first week of age; GSSG-R: glutathione reductase; GSH-Px: glutathione peroxidase. Hepatic GSH concentrations was higher (‡: p<0.05) at 14 weeks for both diets but lower (**: p<0.01) in DC group whatever the age. The DC lowered (††: p<0.01) hepatic GSSG only at 1-week old. GSH and GSSG levels in erythrocytes were not different between diets, however GSH level was higher at 14 weeks (‡‡: p<0.01). Hepatic GSSG-R activity was higher in DC groups (*: p<0.05) whatever the age whereas GSH-Px was higher at 14 weeks (‡‡: p<0.01) independently of diet. Means ± s.e.m., n= 4-8.

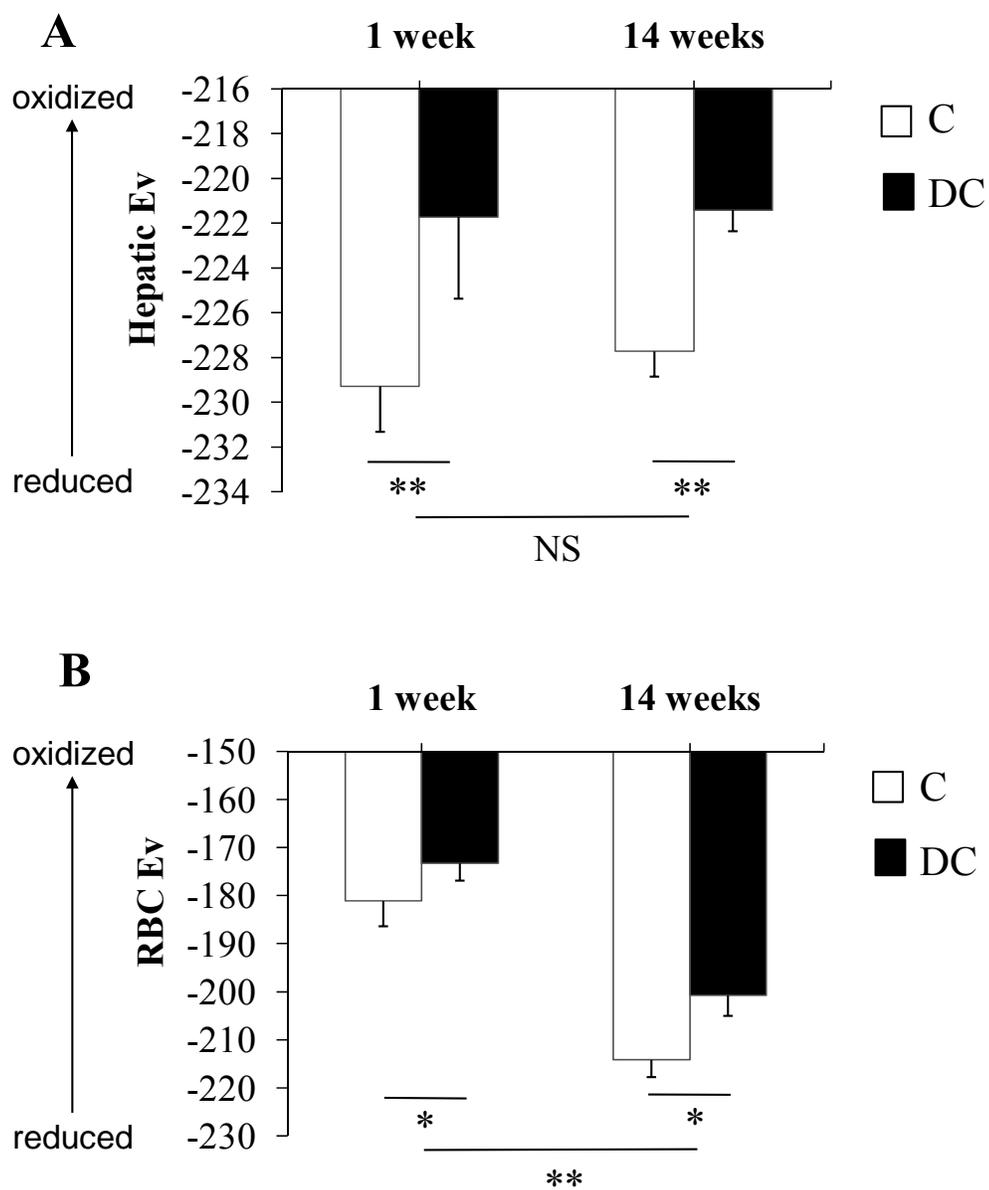
Figure 1

Figure 2

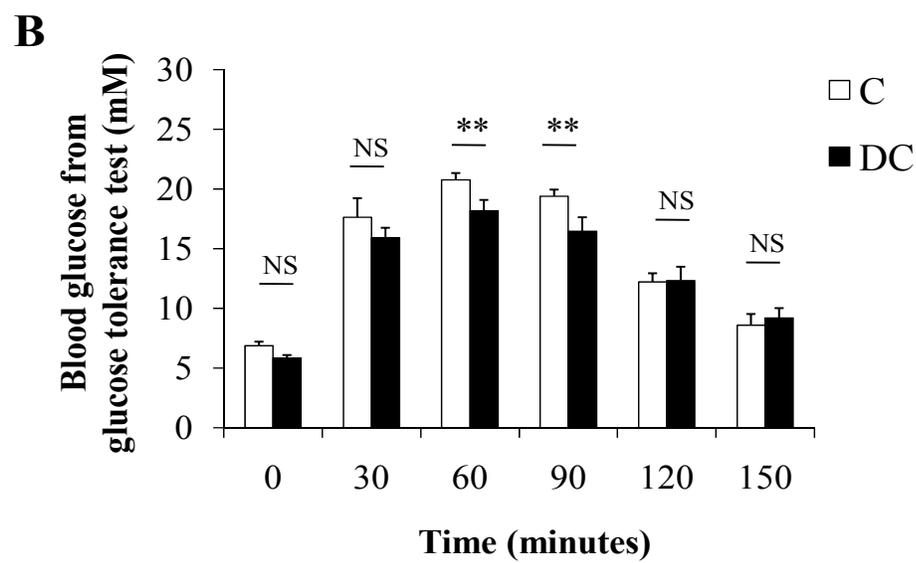
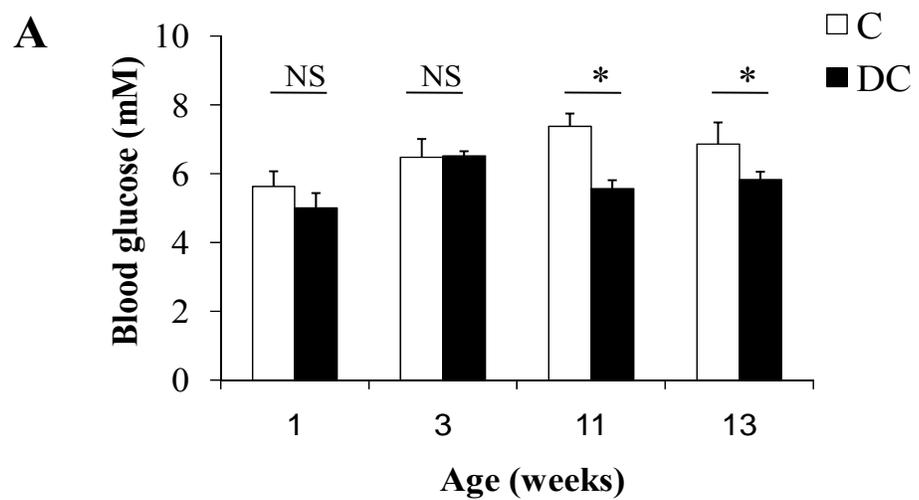


Figure 3

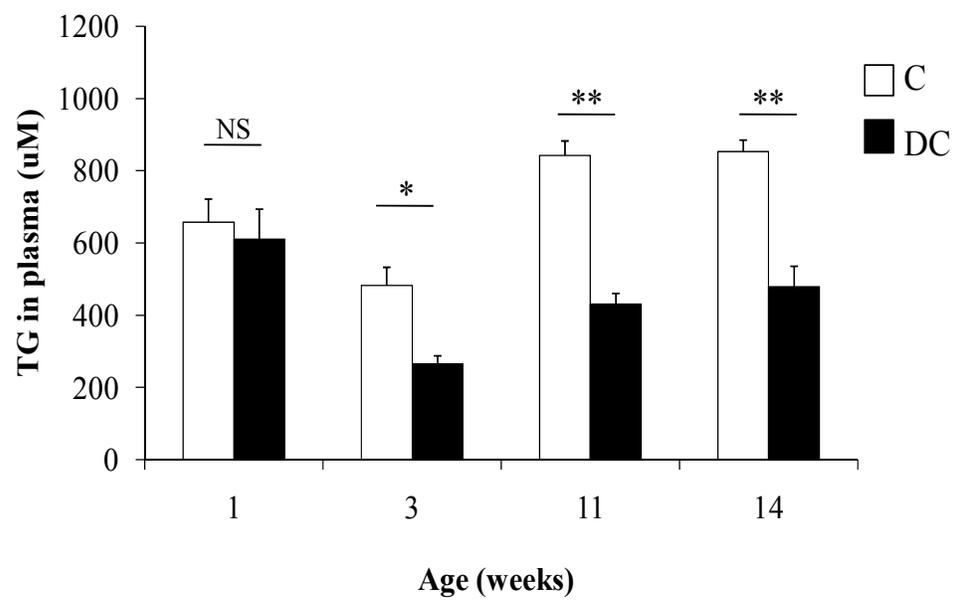


Figure 4

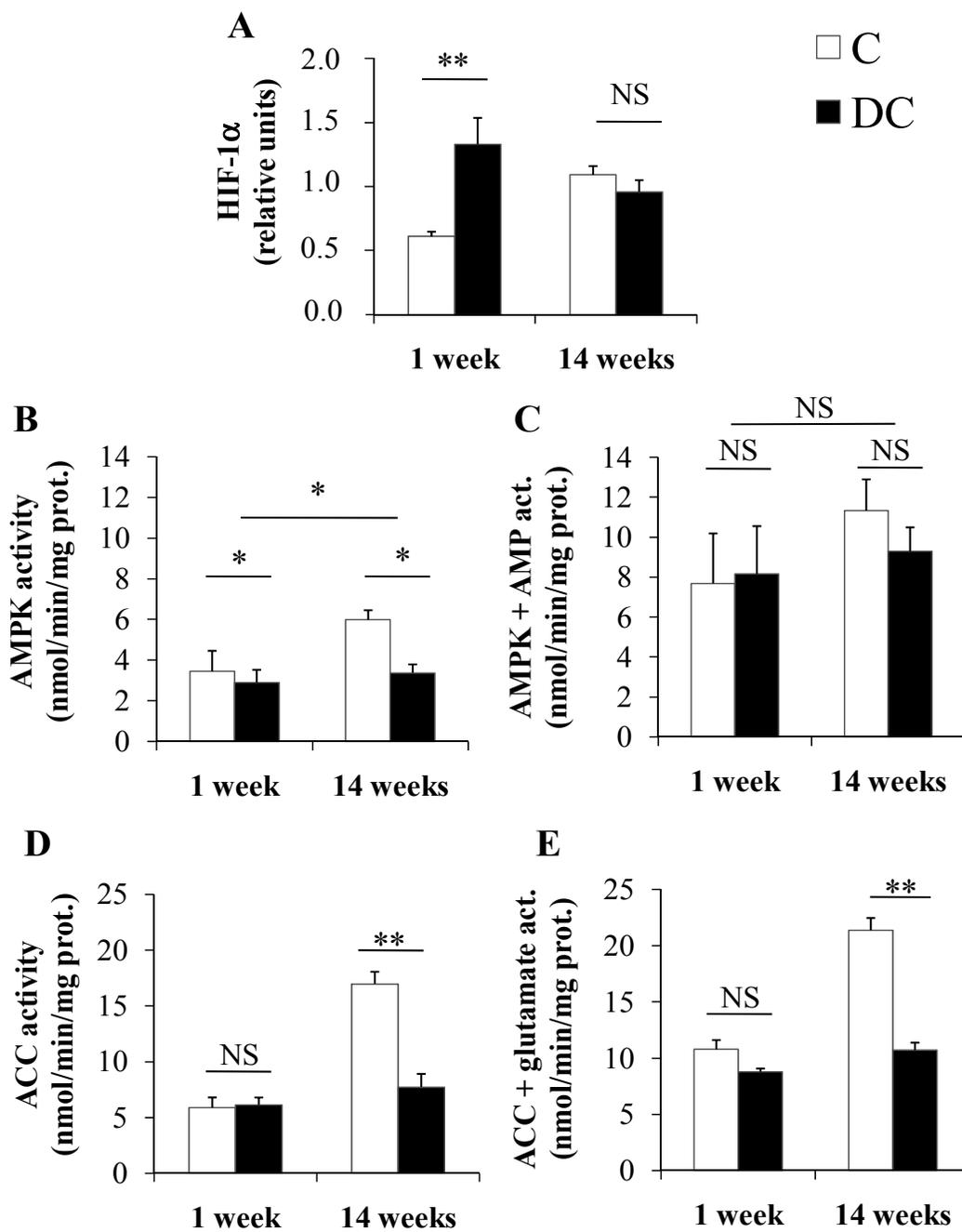


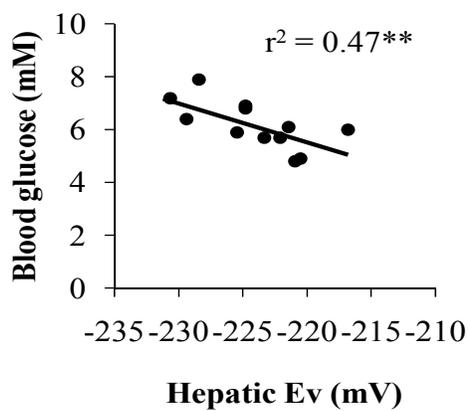
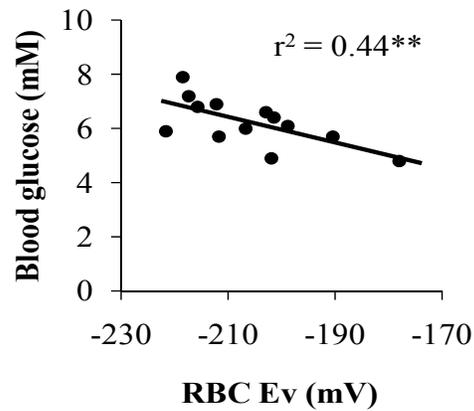
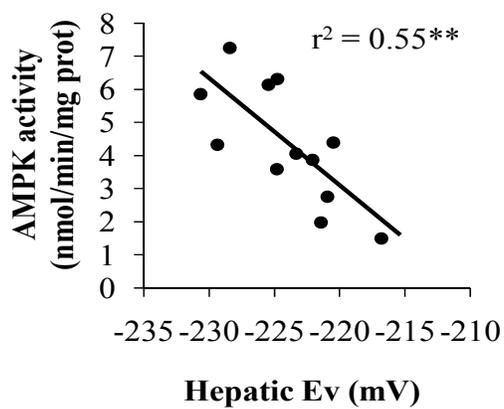
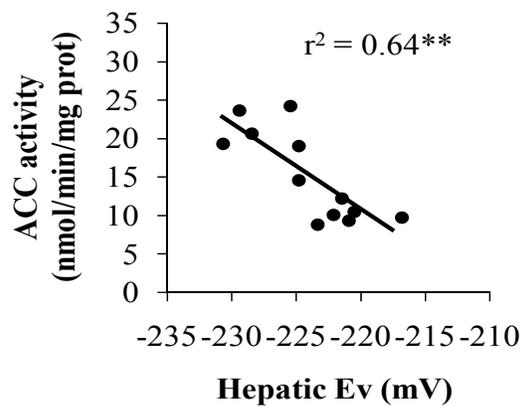
Figure 5**A****B****C****D**

Figure legends

Figure 1. Hepatic and red blood cells (RBC) redox potential of glutathione (Ev).

C: animals fed with control chow diet during their first week of age (open bar); DC: animals fed with deficient chow diet during their first week of age (black bar). (A) Hepatic redox potential of glutathione was more oxidized ($p < 0.01$) in animals fed with DC diet during their first week of life. No effect of age and no interaction between parameters. (B) RBC redox potential of glutathione was more oxidized ($p < 0.05$) in animals fed with DC diet and at 1-week old ($p < 0.01$). No interaction between parameters. Means \pm s.e.m., $n = 4-7$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, NS: not statistically significant.

Figure 2. Blood glucose concentrations.

C: animals fed with control chow diet during their first week of age (open bar); DC: animals fed with deficient chow diet during their first week of age (black bar). (A) The significant ($p < 0.05$) interaction between age and diet allowed us to compare the effect of the diet for each age. Blood glucose of animals fed with DC diet during their first week of life was lower ($p < 0.05$) at 11 and 13 weeks. (B) At 13-week old, animals were challenged with intra peritoneal injection of 2ml/kg of 50% glucose solution. Animals fed with DC diet during their first week of life had lower ($p < 0.01$) blood glucose at 60 and 90 min post injection. Means \pm s.e.m., factorial ANOVA, $n = 4-8$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, NS: not statistically significant.

Figure 3. Plasma triacylglycerol concentration.

C: animals fed with control chow diet during their first week of age (open bar); DC: animals fed with deficient chow diet during their first week of age (black bar). The significant ($p < 0.05$) interaction between age and diet allowed us to compare the effect of the diet for each age. Triacylglycerol concentration in plasma of animals fed with DC diet during their first week of life was lower ($p < 0.05$) at 3, 11 and 14 weeks of age. Means \pm s.e.m., factorial ANOVA, $n = 4-8$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, NS: not statistically significant.

Figure 4. Hepatic AMPK & ACC activities and HIF-1 α protein level.

C: animals fed with control chow diet during their first week of age (open bar); DC: animals fed with deficient chow diet during their first week of age (black bar); HIF-1 α : hypoxia-inducible factor 1 α ; AMPK: AMP-activated protein kinase; ACC: acetylCoA carboxylase. (A) HIF-1 α protein relatively to tubuline: the significant ($p < 0.01$) interaction between age and diet allowed us to compare diet effect for each age. HIF-1 α was higher in animals fed with DC diet only at 1-week old ($p < 0.01$). (B) AMPK activity without exogenous AMP: the activity was lower ($p < 0.05$) in animals fed with DC diet and in 1-week old group. (C) AMPK activity in presence of exogenous AMP as activator: there was no statistically difference between groups. (D) ACC activity without exogenous glutamate and (E) ACC activity in presence of exogenous glutamate (activator): for both ACC activities (D & E), the significant ($p < 0.01$) interaction between age and diet allowed us to compare diet effect for each age. At 14 weeks, the ACC activity was lower ($p < 0.01$) in animals fed with DC diet during their first week of life. Means \pm s.e.m., factorial ANOVA, $n = 4-8$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, NS: not significant.

Figure 5. Associations between blood glucose and redox potential of glutathione in liver and erythrocyte as well as between ACC & AMPK activities and redox potential in liver at 14 weeks of life.

AMPK: AMP-activated protein kinase; ACC: acetylCoA carboxylase; RBC: red blood cells. The hepatic redox potential of glutathione correlated negatively with (A) blood glucose ($y = -0.2 \text{ mM} \cdot \text{mV}^{-1} \cdot x - 28.3 \text{ mM}$, $r^2 = 0.47$, $p < 0.01$), (C) AMPK activity ($y = -0.3 \text{ U} \cdot \text{mV}^{-1} \cdot x - 68.7 \text{ U}$, $r^2 = 0.55$, $p < 0.01$) and (D) ACC activity ($y = -1.2 \text{ U} \cdot \text{mV}^{-1} \cdot x - 244 \text{ U}$, $r^2 = 0.64$, $p < 0.01$). Like for liver, the correlation between erythrocytes (RBC) redox potential and blood glucose (B) was negative ($y = -0.05 \text{ mM} \cdot \text{mV}^{-1} \cdot x - 3.50 \text{ mM}$, $r^2 = 0.44$, $p < 0.01$).

References

1. Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, Varga IS, Kovács A, Kovács L, László A: 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
2. Jain A, Mehta T, Auld PA, Rodrigues J, Ward RF, Schwartz MK, Mårtensson J: Glutathione metabolism in newborns: evidence for glutathione deficiency in plasma, bronchoalveolar lavage fluid, and lymphocytes in prematures. *Pediatr Pulmonol* 20:160-166, 1995
3. Lavoie JC, Chessex P: Gender and maturation affect glutathione status in human neonatal tissues. *Free Radic Biol Med* 23:648-657, 1997
4. Lavoie JC, Rouleau T, Truttmann AC, Chessex P: Postnatal gender-dependent maturation of cellular cysteine uptake. *Free Radic Res* 36:811-817, 2002
5. Guajardo L, Beharry KD, Modanlou HD, Aranda JV: Ascorbic acid concentrations in umbilical cord veins and arteries of preterm and term newborns. *Biol Neonate* 68:1-9, 1995
6. Baydas G, Karatas F, Gursu MF, Bozkurt HA, Ilhan N, Yasar A, Canatan H: Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. *Arch Med Res* 33:276-280, 2002
7. Lavoie JC, Bélanger S, Spalinger M, Chessex P: Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition: the major contributor to in vitro generation of peroxides. *Pediatrics* 99:E6-E13, 1997
8. Weinberger B, Watorek K, Strauss R, Witz G, Hiatt M, Hegyi T: Association of lipid peroxidation with hepatocellular injury in preterm infants. *Crit Care* 6:521-525, 2002
9. Chessex P, Lavoie JC, Rouleau T, Brochu P, St-Louis P, Lévy E, Alvarez F: Photooxidation of parenteral multivitamins induces hepatic steatosis in a neonatal guinea pig model of intravenous nutrition. *Pediatr Res* 52:958-563, 2002
10. Saugstad OD: Bronchopulmonary dysplasia-oxidative stress and antioxidants. *Semin Neonatol* 8:39-49, 2003
11. Davis JM: Role of oxidant injury in the pathogenesis of neonatal lung disease. *Acta Paediatr Suppl* 91:23-5, 2002
12. Buonocore G, Perrone S, Bracci R: Free radicals and brain damage in the newborn. *Biol Neonate* 79:180-186, 2001

13. Taylor DL, Edwards AD, Mehmet H: Oxidative metabolism, apoptosis and perinatal brain injury. *Brain Pathol* 9:93-117, 1999
14. Luo ZC, Fraser WD, Julien P, Deal CL, Audibert F, Smith GN, Xiong X, Walker M: Tracing the origins of "fetal origins" of adult diseases: programming by oxidative stress? *Med Hypotheses* 66:38-44, 2006
15. Nuyt AM: Mechanisms underlying developmental programming of elevated blood pressure and vascular dysfunction: evidence from human studies and experimental animal models. *Clin Sci (Lond)* 114:1-17, 2008
16. Bartrons R, Caro J: Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *J Bioenerg Biomembr* 39(3):223-229, 2007
17. Shaw RJ: Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 18(6):598-608, 2006
18. Viollet B, Mounier R, Leclerc J, Yazigi A, Foretz M, Andreelli F: Targeting AMP-activated protein kinase as a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic disorders. *Diabetes Metab* 33(6):395-402, 2007
19. Viollet B, Foretz M, Guigas B, Horman S, Dentin R, Bertrand L, Hue L, Andreelli F. Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J Physiol* 574(Pt 1):41-53, 2006
20. Omaye ST, Turnbull JD, Sauberlich HE: Selected methods for the determination of ascorbic acid in animals cells, tissues and fluids. *Methods enzymol* 62:3-11, 1979
21. Lavoie JC, Rouleau T, Tsopmo A, Freil J, Chessex P: Influence of lung oxidant and antioxidant status on alveolarization: role of light-exposed total parenteral nutrition. *Free Radic Biol Med* Article in press: p. 10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.018, 2008
22. Yzydorczyk C, Gobeil F Jr, Cambonie G, Lahaie NL, Le S, Samarani S, Ahmad A, Lavoie JC, Oligny LL, Pladys P, Nuyt AM: Exaggerated vasomotor response to ANG II in rats with fetal programming of hypertension associated with exposure to a low-protein diet during gestation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291:1060-1068, 2006
23. Lavoie JC, Chessex P, Gauthier C, Levy E, Alvarez F, St-Louis P, Rouleau T: Reduced bile flow associated with parenteral nutrition is independent of oxidant load and parenteral multivitamins. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 41:108-114, 2005
24. Schafer FQ, Buettner GR: Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30(11):1191-212, 2001

25. Becker K, Wilkinson AR: Flavine adenine dinucleotide levels in erythrocytes of very low birthweight infants under vitamin supplementation. *Biol Neonate* 63:80-85, 1993
26. Lavoie JC, Chessex P: Gender and maturation affect glutathione status in human neonatal tissues. *Free Radic Biol Med* 23:648-657, 1997
27. Chessex P, Lavoie JC, Laborie S, Vallee J: Survival of guinea pig pups in hyperoxia is improved by enhanced nutritional substrate availability for glutathione production. *Pediatr Res* 46(3):305-310, 1999
28. Folch J, Lees M, Stanley SGH: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226(1):497-509, 1956
29. Makinde AO, Gamble J, Lopaschuk GD: Upregulation of 5'-AMP-Activated protein kinase is responsible for the increase in myocardial fatty acid oxidation rates following birth in the newborn rabbit. *Circ Res* 80:482-489, 1997
30. 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* 270(29):17513-17520, 1995
31. Knafo L, Chessex P, Rouleau T, Lavoie JC: Association between hydrogen peroxide-dependent byproducts of ascorbic acid and increased hepatic acetyl-CoA carboxylase activity. *Clin Chem* 51(8):1462-1471, 2005
32. Boone AN, Chan A, Kulpa JE, Brownsey RW: Bimodal activation of acetyl-CoA carboxylase by glutamate. *J Biol Chem* 275(15):10819-10825, 2000
33. Gaussin V, Hue L, Stalmans W, Bollen M: Activation of hepatic acetyl-CoA carboxylase by glutamate and Mg²⁺ is mediated by protein phosphatase-2A. *Biochem J* 316:217-224, 1996
34. Knowles HJ, Raval RR, Harris AL, Ratcliffe PJ: Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells. *Cancer Res* 63:1764-1768, 2003
35. Hardie DG, Hawley SA: AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays* 23:1112-1119, 2001
36. Kemp BE, Mitchelhill KI, Stapleton D, Michell BJ, Chen ZP, Witters LA: Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends Biochem Sci* 24:22-25, 1999

37. Fryer LG, Fougelle F, Barnes K, Baldwin SA, Woods A, Carling D: Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells. *Biochem J* 363:167-174, 2002
38. Rosemeyer MA: The biochemistry of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase. *Cell Biochem Funct* 5:79-95, 1987
39. García-Alfonso C, Martínez-Galisteo E, Llobell A, Bárcena JA, López-Barea J: Regulation of horse-liver glutathione reductase. *Int J Biochem* 25:513-520, 1993
40. Mahadev K, Zilbering A, Zhu L, Goldstein BJ: Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *J Biol Chem* 276:21938-21942, 2001
41. Rao RK, Li L, Baker RD, Baker SS, Gupta A: Glutathione oxidation and PTPase inhibition by hydrogen peroxide in Caco-2 cell monolayer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G332-G340, 2000
42. Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR: Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem Pharmacol* 64:1057-1064, 2002
43. DeGnore JP, König S, Barrett WC, Chock PB, Fales HM: Identification of the oxidation states of the active site cysteine in a recombinant protein tyrosine phosphatase by electrospray mass spectrometry using on-line desalting. *Rapid Commun Mass Spectrom* 12:1457-1462, 1998
44. Fiaschi T, Buricchi F, Cozzi G, Matthias S, Parri M, Raugei G, Ramponi G, Chiarugi P: Redox-dependent and ligand-independent trans-activation of insulin receptor by globular adiponectin. *Hepatology* 46:130-139, 2007
45. Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan CC, Ramachandran C, Gresser MJ, Tremblay ML, Kennedy BP: Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 283:1544-1548, 1999
46. Brownsey RW, Boone AN, Elliott JE, Kulpa JE, Lee WM: Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans* 34:223-227, 2006
47. Girard J, Perdereau D, Fougelle F, Prip-Buus C, Ferré P: Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *FASEB J* 8:36-42, 1994
48. Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D, Witters LA: Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol* 276:E1-E18, 1999

49. Kemp M, Go YM, Jones DP: Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. *Free Radic Biol Med* 44:921-937, 2008
50. Hitchler MJ, Domann FE: An epigenetic perspective on the free radical theory of development. *Free Radic Biol Med* 43:1023-1036, 2007

10. Autres résultats

Autres que les résultats de l'article présenté précédemment, certains résultats pertinents avaient été obtenus au cours de mon projet de maîtrise et ceux-ci seront cités ci-dessous. Les détails de la méthodologie pour ces résultats ont été décrits dans le chapitre 8.

Relevé des apports nutritionnels moyens en énergie, macronutriments et méthionine

Le **tableau I** (mémoire) présente les apports moyens des jours 3 et 4 en énergie, macronutriments et méthionine pour les groupes de 1 semaine de vie. Les apports en méthionine ont été présentés puisque ce nutriment n'était pas complètement déplété de la diète restreinte et il est important pour la synthèse du glutathion. Les cobayes sous diète restreinte avaient des apports moindres en énergie ($t_{(6)}=3,4$; $p<0,05$), en protéines (ou acides aminés) ($t_{(6)}=3,8$; $p<0,01$), en méthionine ($t_{(6)}=4,0$; $p<0,01$) et en glucides ($t_{(6)}=3,5$; $p<0,05$), mais pas en lipides ($t_{(6)}=2,3$) par rapport aux cobayes sous la diète standard. Les apports moyens des jours 3 et 4 pour les cobayes sous diète restreinte qui ont été suivis jusqu'à 14 semaines de vie ont été prélevés, mais pas inclus dans cette analyse puisque les données n'ont pas été collectées pour les témoins suivis jusqu'à 14 semaines de vie. Par contre, si l'on compare leurs apports moyens aux contrôles de 1 semaine de vie, ceux-ci étaient aussi plus faibles en énergie ($t_{(10)}=2,4$; $p<0,05$), en protéines (ou acides aminés) ($t_{(10)}=2,9$; $p<0,05$), en méthionine ($t_{(10)}=3,2$; $p<0,01$) et en glucides ($t_{(10)}=2,7$; $p<0,05$), mais pas en lipides ($t_{(10)}=0,6$). De plus faibles apports en énergie, acides aminés et méthionine pourraient expliquer le plus faible gain de poids entre les jours 1 et 4 de la période test (première semaine de vie) chez les cobayes ayant reçu la diète restreinte (DC: $4,6\pm 1,3$; C: $18,5\pm 2,4$ g; $t_{(20)}=5,4$; $p<0,01$), malgré qu'il n'y ait pas de différence significative dans les poids obtenus à 1 semaine de vie entre les deux groupes de diète (article - *Results*).

Métabolisme énergétique : concentrations de pyruvate hépatique

La **figure 4A** (mémoire) présente les concentrations de pyruvate hépatique pour chacun des groupes. Il n'y avait aucune interaction entre la diète et l'âge ($F_{(1,17)}=0,6$). On observe qu'il n'y avait pas d'effet de la diète sur les niveaux de pyruvate au foie peu importe l'âge ($F_{(1,17)}=3,2$). Toutefois, on observe des niveaux plus élevés en pyruvate à 14 semaines de vie ($F_{(1,17)}=13,1$; $p<0,01$). Malgré l'absence de différence en pyruvate entre les deux diètes,

celui-ci corrèle positivement avec les niveaux de HIF-1 α à 1 semaine de vie (mémoire - **figure 4B**) ($F_{(1,7)}=11,0$; $r^2=0,61$; $p<0,05$), mais ne corrèle pas à 14 semaines de vie ($F_{(1,11)}=1,6$; $r^2=0,13$). Ce qui appuie le fait que le HIF-1 α active la voie de la glycolyse pour former davantage de pyruvate.

Tableau I : Relevé des apports nutritionnels moyens en énergie, macronutriments et méthionine durant la 1^{re} semaine de vie.

Exprimés par 100 g de poids corporel/jour	Groupe de 1 semaine C	Groupe de 1 semaine DC
Énergie (kcal)	20,0 \pm 2,5	8,3 \pm 0,5 †
Protéines ou AA (g)	1,49 \pm 0,18	0,44 \pm 0,03 ††
Méthionine (g)	24,1 \pm 3,0	4,8 \pm 0,3 ††
Lipides totaux (g)	0,37 \pm 0,05	0,24 \pm 0,02
Glucides ¹ (g)	4,3 \pm 0,5	1,5 \pm 0,1 †

C: animaux ayant été nourris avec la diète standard durant la première semaine de vie; DC: animaux ayant été nourris avec la diète déficiente durant la première semaine de vie. AA: acides aminés. Le tableau présente les apports moyens des jours 3 et 4 au cours de la période test (1^{re} semaine de vie) pour les cobayes du groupe de 1 semaine seulement. Par rapport aux cobayes sur la diète standard, les apports moyens des cobayes sur la diète déficiente sont plus faibles en énergie († : $p<0,05$), en protéines (ou AA) (†† : $p<0,01$), en méthionine (†† : $p<0,01$) et en glucides († : $p<0,05$). Moyennes \pm s.e.m., $n=4$. ¹Les glucides exclus les fibres.

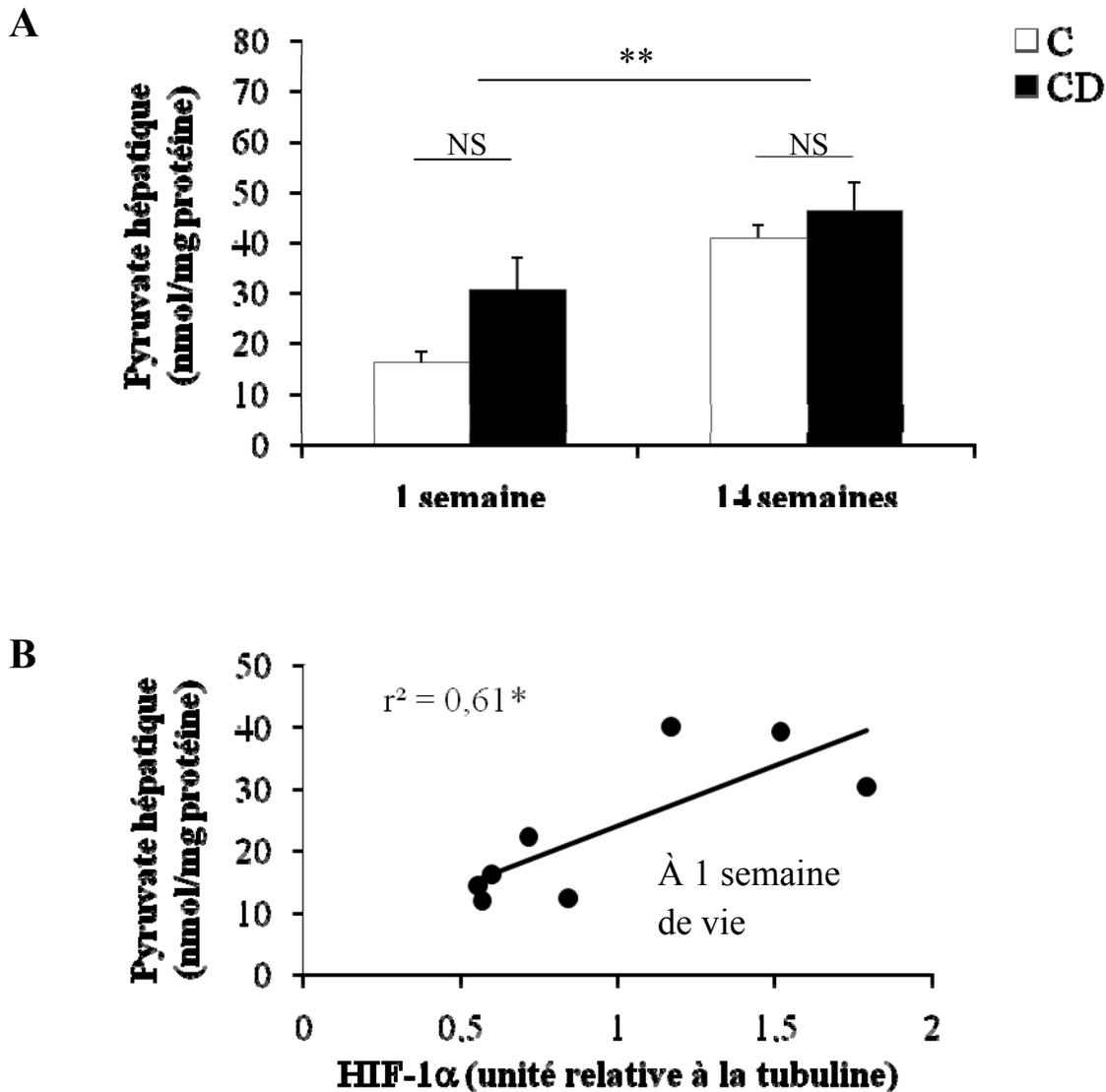


Figure 4. Concentrations de pyruvate hépatique et corrélation avec le HIF-1 α .

C: animaux ayant été nourris avec la diète standard durant la première semaine de vie; DC: animaux ayant été nourris avec la diète déficiente durant la première semaine de vie. (A) Aucune interaction entre les paramètres. Aucun effet de la diète concernant les concentrations de pyruvate hépatique. Le pyruvate était plus élevé à 14 semaines de vie pour les deux diètes ($p < 0,01$). Moyennes \pm s.e.m., $n = 4-8$, NS : non significatif. (B) Les concentrations de pyruvate corrélaient positivement avec les niveaux de HIF-1 α à 1 semaine de vie ($y = 19,5 \text{ nmol} \cdot U^{-1} \cdot x \pm 4,4 \text{ nmol}$; $r^2 = 0,61$; $p < 0,05$).

11. Discussion globale

Les prématurés sont à risque élevé de subir un stress oxydant néonatal important suite aux traitements qui leur sont administrés, dont l'administration d'une NP contaminée par des peroxydes (8), en plus qu'ils possèdent une défense antioxydante inefficace et/ou immature (2-6). Certaines complications hépatiques et lipidiques surviennent chez ces prématurés (14, 16) et il est connu que ceux-ci ont des niveaux de glutathion grandement abaissés (1, 3). Les effets métaboliques à long terme d'un stress oxydant néonatal sont encore peu connus, mais fort probables (174, 176, 178-181).

Ainsi, l'hypothèse globale est qu'une rupture de l'équilibre entre l'apport de molécules oxydantes et la défense antioxydante perturbe le métabolisme de l'énergie en période néonatale et que ces complications sont maintenues dans le temps par des phénomènes épigénétiques. Dans le cadre de mon projet de maîtrise, contrairement aux études effectuées avec la NP (charge oxydante) chez les cobayes, on devait tenter d'initier un stress oxydant néonatal via une diète déficiente en nutriments essentiels aux défenses antioxydantes chez les cobayes et d'observer les effets sur certains marqueurs clés du métabolisme de l'énergie hépatique à long terme. Cette diète restreinte ou une diète standard (article - **Table 1**) a donc été donnée *ad libitum* à des cobayes de trois jours de vie, et ce, pendant quatre jours, suivi d'une diète standard jusqu'à 14 semaines de vie, début de la maturité sexuelle. Bien qu'il ait été aussi pertinent d'analyser les données avec des cobayes plus âgés, notre objectif ici était de voir l'apparition de complications dès le début de l'âge adulte, au moment où la période de croissance importante est terminée. De plus, on ne pouvait pas faire les analyses plus tôt puisque la période de croissance importante augmente les besoins énergétiques et l'on ne voulait pas que ce facteur affecte les complications qu'on souhaitait observer au niveau des cibles métaboliques à l'étude.

Avant d'initier les analyses du métabolisme énergétique, il était essentiel de vérifier si l'on avait initié un stress oxydant néonatal avec la diète restreinte. L'évaluation des défenses antioxydantes à 1 semaine de vie a révélé que certains paramètres avaient été affectés.

D'abord, les concentrations de vitamine C au foie étaient deux fois plus faibles, même après seulement quatre jours sous la diète restreinte, et les niveaux de CuZn-SOD étaient plus

élevés à 1 semaine de vie. Il a déjà été rapporté qu'une déficience en vitamine C durant trois semaines chez des cobayes en sevrage avait engendré une baisse des niveaux de vitamine E et d'activité de la SOD au foie (128). En contrepartie, une hausse de l'expression de la Mn-SOD serait normalement rencontrée en présence d'un stress oxydant (37). Dans ce contexte-ci, la déficience en vitamine C ne semble pas avoir été assez longue afin d'engendrer une déplétion de la vitamine E, même si cette vitamine était aussi absente de la diète. Il est possible que les O_2^{\bullet} ne soient pas aussi bien éliminés par la vitamine C, ce qui pourrait expliquer la hausse des niveaux de la CuZn-SOD, malgré que cet effet ait plutôt été observé pour la Mn-SOD (37). Suite à l'introduction de la diète standard, les niveaux de vitamine C et SOD hépatiques avaient rejoint ceux du groupe témoin lors des analyses à 14 semaines de vie.

Une des faiblesses de cette étude est l'utilisation des niveaux de protéines des SOD plutôt que la mesure de leur activité, faute de temps pour la mise au point de la méthode. Toutefois, face aux résultats obtenus, il est possible qu'une restriction de quatre jours n'ait pas été suffisante pour avoir affecté la disponibilité en cuivre, zinc et manganèse qui sont nécessaires à la synthèse des SOD et donc, n'aurait peut-être pas affecté autant l'activité des enzymes.

Un second effet très important de la diète restreinte est la baisse des niveaux hépatiques de GSH observés à 1 semaine de vie, créant ainsi un redox au foie plus oxydé chez ces cobayes. Ce qui corrobore avec la baisse du GSH observée chez les prématurés (1, 3). De plus, l'activité de la GSSG-R est augmentée, comme il a déjà été observé en condition de stress oxydant où les niveaux de GSH sont abaissés (GSH est un inhibiteur de l'enzyme) (190). Ce qui pourrait expliquer aussi la baisse de GSSG observée chez le groupe restreint. Ainsi, une déplétion de la riboflavine durant quatre jours n'a pas été suffisante pour affecter l'activité de la GSSG-R. Les causes pouvant expliquer la baisse du GSH hépatique observée à 1 semaine de vie pourraient être attribuable à :

- 1) une déficience en méthionine et cystéine nécessaires à sa synthèse (38),
- 2) une hausse de l'utilisation du GSH pour fournir la cystéine nécessaire à la synthèse protéique, où une mesure de l'activité de la γ -glutamyltranspeptidase tissulaire (libération de la cystéine du GSH) (38) serait un moyen de statuer sur cette option.

Un élément surprenant de cette étude est que, même après l'introduction de la diète standard après la 1^{re} semaine de vie avec la diète restreinte, les niveaux hépatiques de GSH restent plus bas et le redox plus oxydé par rapport aux témoins, en présence encore d'une GSSG-R plus active. Il est toutefois important de noter que la différence entre le redox hépatique du groupe restreint et témoin n'est pas très grande, mais pourrait influencer la régulation de certaines voies métaboliques. Afin d'expliquer la baisse de GSH, la synthèse, l'utilisation et l'exportation de celui-ci vers les autres tissus devraient être prises en considération, mais les causes exactes n'ont pas pu être déterminées dans le cadre de mon projet. Toutefois, diverses hypothèses ont été élaborées.

- 1) Un phénomène d'épigénétique. La déplétion en glutathion observée à 1 semaine de vie aurait pu entraîner une baisse dans les niveaux de SAM nécessaires à la méthylation de l'ADN puisque la voie de la transsulfuration est augmentée en présence d'un redox plus oxydé (57, 58) et abaisserait ainsi la voie de la reméthylation, ainsi que les niveaux de méthionine (précurseur du SAM). Cette condition en période néonatale aurait pu créer une hypométhylation de certains gènes dans le métabolisme de la méthionine, cystéine ou du glutathion de telle sorte que les niveaux de glutathion restent abaissés à long terme.

Il est connu que la glutathion S-transférase peut être davantage activée une fois hypométhylée suite à une diète pauvre en groupements méthyles (méthionine, choline et folate) (191, 192). L'hypométhylation de cette enzyme serait réversible seulement si les apports normaux en groupements méthyles étaient initiés avant la neuvième semaine sur la diète déficiente (191). Dans notre condition, la diète standard a été introduite après quatre jours de diète restreinte, ce qui laisse soupçonner que cette période n'était peut-être pas assez longue pour réellement hypométhyliser des gènes, quoique cette période pourrait être plus courte pour certains gènes.

- 2) Un phénomène de glutathionylation. L'autre hypothèse pouvant mener à une baisse de GSH hépatique serait la présence de protéines davantage glutathionylées (protéine-SSG) chez les cobayes ayant reçu une diète restreinte durant leur 1^{re}

semaine de vie. Seules les molécules de GSH et GSSG pouvaient être mesurées lors du dosage à l'électrophorèse capillaire et ne tiennent pas compte des adduits avec d'autres molécules. Tel qu'il a été discuté brièvement dans la section 2.2.1., la glutathionylation surviendrait davantage suite à l'oxydation des thiols de certaines protéines par la liaison d'un pont disulfure avec un GSH, contrairement à l'adduction d'un GSSG à un thiol réduit d'une protéine (protéine-SH) (43).

Dans notre condition, on est en présence d'une baisse en GSH malgré une GSSG-R plus active, ainsi que des concentrations semblables de GSSG et d'activité de la GSH-Px. Ce qui est étrange puisqu'on s'attendrait à une baisse des niveaux de GSSG avec cette cinétique, comme il a été observé à 1 semaine de vie. L'explication pourrait venir du fait que le renversement de la glutathionylation d'une protéine est catalysé par la glutaredoxine (principalement) et elle utilise du GSH comme substrat et produit du GSSG (43). Ce GSSG devrait donc être réduit en GSH par la GSSG-R. Ainsi, la GSH-Px ne serait donc pas impliquée dans ce processus et expliquerait l'absence d'une baisse en GSSG.

Toutefois, les causes menant à une hausse de la glutathionylation des protéines resteraient à être expliquée (hausse de l'oxydation des thiols de ces protéines ?) et ce processus s'avère être un processus fort complexe, mais très important dans la signalisation cellulaire, notamment auprès de plusieurs protéines tyrosine phosphatases (43). Cet élément fera d'ailleurs partie des explications relatives aux perturbations métaboliques à long terme obtenues au cours de cette étude.

Ainsi, la diète restreinte administrée durant la 1^{re} semaine de vie a engendré un stress oxydant néonatal caractérisé par une baisse des concentrations de vitamine C et de GSH hépatiques, rendant le foie dans un état plus oxydé. Les niveaux de GSH restent abaissés et le redox hépatique plus oxydé même après l'introduction d'une diète standard jusqu'à 14 semaines de vie. Les effets sur le métabolisme énergétique hépatique à court et à long terme ont été abordés dans la discussion du précédent article et seront globalement discutés ci-dessous en liens avec les autres résultats présentés dans le mémoire et la revue de la littérature présentée en introduction.

Comme attendu, les niveaux de HIF-1 α étaient plus élevés à 1 semaine de vie et ceci serait expliqué en partie par de plus faibles concentrations de vitamine C dans le foie. Cette vitamine est nécessaire pour l'activité de la proline hydroxylase, enzyme essentielle pour la dégradation du HIF-1 α par les protéasomes (124, 125). D'ailleurs, les taux de vitamine C et de HIF-1 α hépatiques reviennent à des niveaux comparables aux témoins à 14 semaines de vie. Tel que présenté dans l'hypothèse de départ, on s'attendrait à ce qu'une hausse du HIF-1 α augmente la formation de pyruvate et d'ATP suite à une stimulation de la glycolyse, suivi d'une inhibition de l'AMPK (baisse phosphorylation) du à une baisse du ratio AMP/ATP, ce qui rendrait ainsi l'ACC plus active (moins phosphorylée) pour former davantage de TG hépatiques et plasmatiques. Bien qu'à 1 semaine de vie il existe une corrélation positive entre le HIF-1 α et les concentrations de pyruvate hépatique et que l'AMPK était moins active, puisque moins phosphorylée, il n'y avait pas de différence dans les niveaux de pyruvate, ni dans l'activité de l'ACC, ni dans les niveaux de TG hépatiques et plasmatiques.

Devant cette problématique, on s'est interrogé sur les effets métaboliques qu'auraient pu avoir les apports énergétiques moindres chez les cobayes ayant reçu la diète restreinte (**tableau 4**). Cette diète synthétique était moins palatable que la diète standard à base de céréales, ce qui a donc diminué leurs apports en diète. Une diète standard synthétique équivalente à la diète restreinte, mais avec les nutriments cibles ajoutés aurait permis de réduire ce facteur confondant. Ainsi, en présence d'un déficit énergétique, on s'attendrait à une baisse de la lipogenèse et à une hausse de la β -oxydation afin de fournir davantage d'ATP, ce qui ne se confirme pas pour l'ACC et les niveaux de TG hépatiques à 1 semaine de vie. D'ailleurs, la baisse de l'activité de l'AMPK est étrange dans le contexte de déficience en énergie (hausse ratio AMP/ATP), malgré qu'il ne faille pas oublier que le HIF-1 α pourrait venir stimuler suffisamment la glycolyse pour fournir davantage d'ATP, ce qui pourrait inhiber l'AMPK par une baisse du ratio AMP/ATP. Bref, le déficit énergétique durant la 1^{re} semaine de vie des cobayes sous la diète restreinte ne semble pas avoir eu un impact majeur à court terme sur les cibles métaboliques, quoique des répercussions à long terme ne puissent pas être exclues.

Les effets métaboliques à long terme ont été analysés à 14 semaines de vie. Étant donné l'absence de différence dans les niveaux de HIF-1 α , on s'attendrait à ce qu'il n'y ait plus de différences pour les autres cibles métaboliques, à moins qu'il y ait eu un phénomène épigénétique suite au traitement reçu au cours de la 1^{re} semaine de vie, tel qu'on avait émis comme hypothèse de départ.

Étrangement, les TG plasmatiques sont restés à des niveaux stables dans le temps chez les cobayes ayant reçu la diète restreinte, comparativement à une hausse des TG plasmatiques chez les témoins. Ce résultat n'est pas expliqué par une baisse des TG hépatiques puisque ceux-ci sont aux mêmes niveaux à 14 semaines de vie, mais serait expliqué en partie par une ACC moins active. Ce qui est intrigant, c'est que la baisse de l'activité de l'ACC ne semble pas être expliquée par une hausse de sa phosphorylation, puisque même après avoir stimulé la PP2A avec le glutamate (déphosphoryle l'ACC) (153, 154), l'ACC reste moins active chez le groupe restreint. Ce qui laisse croire que c'est plutôt l'expression de l'ACC qui serait plus affectée. Comme abordé dans l'article, on avait observé une plus grande sensibilité à l'insuline chez le groupe restreint, expliquée par une élévation moins grande de la glycémie lors du test de tolérance au glucose, ce qui aurait comme conséquence de prévenir une hausse de l'insulinémie, contrairement au groupe témoins. Effectivement, le groupe témoin pourrait avoir une insulinémie plus élevée en compagnie d'une glycémie plus élevée, ce qui entraînerait une condition où le SREBP-1c et le ChREBP viendraient activer l'expression de l'ACC chez les témoins (151).

Suite à des tests préliminaires concernant l'analyse des niveaux de protéines de l'ACC par *western blot* (collaboration avec le Dr Mounib Elchebly, données non présentées dans ce mémoire), l'ACC serait plus phosphorylée, mais les niveaux protéiques ne semblent pas différents entre les deux groupes. Ainsi, se pourrait-il que la PP2A (une protéine tyrosine phosphatase) n'arrive pas à déphosphoryler l'ACC lors de l'ajout de glutamate dans le milieu réactionnel ? Face à la corrélation négative entre le redox hépatique et l'activité de l'ACC (plus le milieu est oxydé, moins l'ACC est active) et la possibilité que la PP2A puisse être inhibée par une glutathionylation (193), il est probable que le maintien d'un redox plus oxydé chez le groupe restreint permet d'inhiber la voie de la lipogenèse en empêchant l'ACC d'être déphosphorylée.

Le même phénomène de glutathionylation pourrait être observé avec la protéine tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B), nécessaire à la déphosphorylation du récepteur de l'insuline (43, 194, 195). Ainsi, la PTP-1B pourrait être moins active avec un redox plus oxydé, permettant au récepteur de l'insuline d'être plus phosphorylé et d'émettre un meilleur signal. Plusieurs données obtenues dans notre étude permettent de prétendre à une meilleure sensibilité à l'insuline via l'augmentation de son signal :

- 1) une moins grande augmentation de la glycémie lors du test de tolérance au glucose provoquée à 13 semaines de vie,
- 2) une glycémie à jeun plus basse et ce, à partir de la 11^e semaine de vie. Cet effet peut être dû à une plus grande entrée du glucose dans les cellules, suite à une stimulation de la glycolyse (au foie) et à l'augmentation des GLUT (dont les GLUT-4 des cellules musculaires et adipeuses), mais aussi par une baisse de la néoglucogenèse au foie puisque cette voie est inhibée par l'insuline. Il existe d'ailleurs une corrélation négative entre la glycémie et le redox hépatique, donc plus l'environnement est oxydé, plus la glycémie est basse,
- 3) une baisse de l'activité de l'AMPK. Ce résultat pourrait s'expliquer par une augmentation de la voie de la glycolyse et aussi de la β -oxydation (puisque l'ACC est inhibée), ce qui augmente la production d'ATP et abaisse le ratio AMP/ATP. Ainsi, l'AMPK reste moins active et pourrait expliquer pourquoi cette enzyme ne suit pas l'activité de l'ACC qui normalement est inhibée par l'AMPK. L'AMPK corrèle aussi négativement avec le redox hépatique, donc plus l'environnement est oxydé, plus l'AMPK est inhibée.

Il aurait été intéressant de mesurer les niveaux de glycogène hépatique afin de confirmer davantage l'efficacité de la voie insulinémique dans le foie puisque l'insuline active la voie de la glycogenèse.

Évidemment, la mesure de l'insulinémie à jeun et le calcul de l'indice HOMA (modèle d'évaluation de l'homéostasie = insuline (mUnité/litre) x glucose (mM)) aurait été utile afin de bien définir la hausse de la sensibilité à l'insuline chez le groupe restreint (196). Malheureusement, les anticorps commerciaux contre l'insuline du cobaye ne sont pas disponibles. Toutefois, il serait pertinent de pouvoir collaborer avec l'équipe de Dr *Yip CC*

de l'Université de Toronto (197, 198) où ils ont réussi à purifier un anticorps contre l'insuline de cobaye (provenant du lapin). D'ailleurs, *Kind KL et al.* ont dernièrement collaboré avec eux pour obtenir ces anticorps et pouvoir mesurer l'insulinémie chez leurs cobayes (199).

Il a déjà été démontré *in vitro* et chez l'animal que l'inhibition de la PTP-1B améliore la sensibilité à l'insuline (194, 195, 200, 201) et prévient le développement de l'obésité (200), deux conditions où les risques de souffrir d'hypertriglycéridémie, et ultimement du syndrome métabolique, sont élevés. D'ailleurs, une surexpression de la PTP-1B serait capable d'augmenter la voie de la lipogenèse via l'activation de PP2A, où celle-ci augmenterait l'expression de SREBP-1c (202). Ainsi, l'inhibition de PTP-1B permettrait à la fois d'augmenter la sensibilité à l'insuline, mais aussi d'inhiber la voie de la lipogenèse. Dans notre condition, l'inhibition de la PTP-1B pourrait être créée par la présence d'un redox hépatique plus oxydé laissant croire à une hausse de sa glutathionylation avec ou sans l'adduction de GSH au PP2A, maintenant ainsi une inhibition de la lipogenèse.

Bien que plusieurs paramètres métaboliques corrélerent avec le redox hépatique, il est toujours possible qu'un phénomène épigénétique puisse influencer l'activité de certaines enzymes du métabolisme de l'énergie en conséquence aux restrictions nutritionnelles subies en période néonatale. Diverses études chez l'animal démontrent une hausse de la durée de vie, une baisse de la glycémie et de l'insulinémie en conséquence à une restriction néonatale en méthionine (32, 68). Chez l'humain, l'allaitement maternel limite les apports nutritionnels chez les prématurés, comparativement à ceux recevant des laits enrichis pour prématurés, ce qui permet de prévenir un gain de poids trop rapide chez ceux-ci et de réduire leurs risques de développer une résistance à l'insuline (199), des dyslipidémies (200), de l'hypertension artérielle (198) et une hypertriglycéridémie (200) à long terme. Par contre, une restriction maternelle (vie fœtale) en nutriments peut avoir des conséquences bien différentes à long terme (169, 203), ce qui nécessite de dissocier les effets à long terme d'une restriction nutritionnelle en période fœtale et postnatale (néonatale). Il aurait été intéressant de pouvoir connaître l'évolution des niveaux de SAM plasmatique et du redox érythrocytaire chez ces prématurés, en fonction de l'évolution de la glycémie, de l'insulinémie et des lipides sanguins. De ce fait, il serait donc possible de connaître davantage le rôle que peut jouer une restriction en nutriments essentiels à la synthèse du

glutathion (méthionine et cystéine) en période néonatale sur le développement des complications métaboliques via l'épigénétique et/ou la modulation du redox du glutathion. Le défi avec les études humaines sera d'arriver à dissocier l'effet d'une carence en méthionine et en cystéine de celle en protéines et en énergie puisque la plupart du temps, ces conditions sont rarement indépendantes l'une de l'autre (204).

Une question à se poser ici c'est la probabilité que ce soit le groupe témoin qui développe des complications métaboliques à long terme comparativement au groupe restreint qui a une triglycérémie et une glycémie plus basses. Selon certaines études effectuées chez des cobayes adultes ayant reçu une diète standard, les TG plasmatiques étaient d'environ 900 μM (205) et la glycémie à jeun autour de 8,3 mM (199). Ce qui correspond aux valeurs obtenues chez nos témoins (TG: $853 \pm 32 \mu\text{M}$) et même légèrement au-dessus en ce qui concerne la glycémie ($6,9 \pm 0,3 \text{ mM}$). Ainsi, nos témoins ne souffriraient probablement pas de complications métaboliques, mais c'est possiblement le groupe restreint qui serait en meilleures conditions que les témoins. Un fait intéressant est que les valeurs de TG plasmatiques du groupe restreint ($480 \pm 57 \mu\text{M}$) correspondent à celles obtenues chez des cobayes adultes ayant reçu une diète supplémentée en 0,05 % d'atorvastatine durant 4 semaines (TG: 560 μM) (206) ou ayant suivi cinq périodes d'exercices physiques par semaine pendant 7 semaines (TG: 540 μM) (205). Ce qui laisse croire que la diète restreinte administrée durant la première semaine de vie chez de cobayes entraînerait les mêmes effets à long terme que l'utilisation de statines et la pratique d'activité physique. Ce qui est très prometteur pour les recherches futures concernant les moyens de prévention des dyslipidémies et du syndrome métabolique.

En regard aux interrogations soulignées au cours de la discussion, il s'avère pertinent de valider ces résultats avec une seconde étude utilisant une diète néonatale restreinte en méthionine et cystéine avec un témoin recevant une diète synthétique isoénergétique et d'analyser :

- 1) les niveaux de SAM plasmatiques à la fin de la durée de la diète restreinte afin de déterminer la possibilité d'une hypométhylation de l'ADN,
- 2) les niveaux de méthylation de gènes ayant des îlots CpG dans la région promotrice et qui seraient impliqués dans le maintien d'un GSH hépatique bas à long terme,

- 3) les niveaux de glutathionylation de protéines tyrosines phosphatases d'intérêt dont la PTP-1B et la PP2A,
- 4) ainsi que certains indices permettant de valider la régulation des voies métaboliques suggérées au cours de la discussion, dont les niveaux d'ATP et d'AMP afin d'expliquer l'inhibition de l'AMPK hépatique, ainsi que l'activité d'enzymes clés de la glycolyse, néoglucogenèse, glycogenèse et β -oxydation au niveau hépatique.

Cette étude permettrait de reconnaître l'importance de ces acides aminés sur la synthèse et le métabolisme du glutathion hépatique en période néonatale et leurs impacts à long terme sur le redox du glutathion et le métabolisme énergétique hépatique.

12. Conclusion

Les principaux éléments à tirer de cette étude et qu'une diète restreinte en nutriments essentiels aux défenses antioxydantes durant seulement la première semaine de vie de cobayes a entraîné une baisse des concentrations de GSH au foie et un redox hépatique plus oxydé à court et à long terme. Le maintien d'un GSH hépatique plus bas à long terme pourrait être la conséquence d'un phénomène épigénétique. Les valeurs plus faibles de TG plasmatiques et des glycémies observées à long terme chez le groupe restreint s'expliqueraient respectivement par une baisse de la lipogenèse et une meilleure sensibilité à l'insuline. La régulation redox de phosphatases impliquées dans ces deux mécanismes, soit la PP2A (active l'ACC) et la PTP-1B (inhibe la voie de l'insuline), pourrait expliquer en partie les niveaux de substrats énergétiques sanguins (TG et glucose) abaissés en présence d'un redox hépatique légèrement plus oxydé. Évidemment, il s'avèrerait nécessaire d'étudier les possibles effets néfastes de la baisse des TG plasmatiques et du glucose sanguin à long terme puisque ce sont des substrats énergétiques importants de l'organisme. Toutefois, il est surprenant de réaliser que l'abaissement des niveaux de GSH en période néonatale ne semble pas toujours néfaste et pourrait même aider à prévenir certaines complications métaboliques à long terme, dont plusieurs font parties du syndrome métabolique et sont des facteurs de risque des maladies cardiovasculaires. Face aux niveaux de GSH grandement abaissés chez les prématurés et ces résultats, il semble prudent de ne pas intervenir de façon agressive dans les traitements antioxydants (207), d'autant plus que l'environnement redox est un important régulateur du métabolisme (26, 208) et du développement fœtal et postnatal (26).

LES SOURCES DOCUMENTAIRES

1. Lavoie J-C, Chessex P. Gender and maturation affect glutathione status in human neonatal tissues. *Free Radical Biology Medecine* 1997;23:648-657.
2. Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, et al. Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;103:136-9.
3. Jain A, Mehta T, Auld PA, et al. Glutathione metabolism in newborns: evidence for glutathione deficiency in plasma, bronchoalveolar lavage fluid, and lymphocytes in prematures. *Pediatr Pulmonol* 1995;20:160-6.
4. Lavoie JC, Rouleau T, Truttmann AC, Chessex P. Postnatal gender-dependent maturation of cellular cysteine uptake. *Free Radic Res* 2002;36:811-7.
5. Guajardo L, Beharry KD, Modanlou HD, Aranda JV. Ascorbic acid concentrations in umbilical cord veins and arteries of preterm and term newborns. *Biol Neonate* 1995;68:1-9.
6. Baydas G, Karatas F, Gursu MF, et al. Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. *Arch Med Res* 2002;33:276-80.
7. Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291:1304-51.
8. Lavoie JC, Belanger S, Spalinger M, Chessex P. Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition: the major contributor to in vitro generation of peroxides. *Pediatrics* 1997;99:E6.
9. Saugstad OD. Bronchopulmonary dysplasia-oxidative stress and antioxidants. *Semin Neonatol* 2003;8:39-49.
10. Davis JM. Role of oxidant injury in the pathogenesis of neonatal lung disease. *Acta Paediatr Suppl* 2002;91:23-5.
11. Saugstad OD. Oxygen and retinopathy of prematurity. *J Perinatol* 2006;26 Suppl 1:S46-50; discussion S63-4.
12. Buonocore G, Perrone S, Bracci R. Free radicals and brain damage in the newborn. *Biol Neonate* 2001;79:180-6.
13. Taylor DL, Edwards AD, Mehmet H. Oxidative metabolism, apoptosis and perinatal brain injury. *Brain Pathol* 1999;9:93-117.

14. 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.
15. Chessex P, Lavoie JC, Rouleau T, et al. Photooxidation of parenteral multivitamins induces hepatic steatosis in a neonatal guinea pig model of intravenous nutrition. *Pediatr Res* 2002;52:958-63.
16. Khashu M, Harrison A, Lalari V, Lavoie JC, Chessex P. Impact of shielding parenteral nutrition from light on routine monitoring of blood glucose and triglyceride in preterm neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2008.
17. Fenster CP, Weinsier RL, Darley-Usmar VM, Patel RP. Obesity, aerobic exercise, and vascular disease: the role of oxidant stress. *Obes Res* 2002;10:964-8.
18. Couillard C, Ruel G, Archer WR, et al. Circulating levels of oxidative stress markers and endothelial adhesion molecules in men with abdominal obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:6454-9.
19. Moller P, Wallin H, Knudsen LE. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chem Biol Interact* 1996;102:17-36.
20. Lambert M, Paradis G, O'Loughlin J, Delvin EE, Hanley JA, Levy E. Insulin resistance syndrome in a representative sample of children and adolescents from Quebec, Canada. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28:833-41.
- 20a. Hovi P, Andersson S, Eriksson JG, Järvenpää AL, Strang-Karlsson S, Mäkitie O, Kajantie E. Glucose regulation in very young adults with very low birth weight. *N Engl J Med* 2007;356:2053-63.
- 20b. Eriksson JG, Osmond C, Kajantie E, Forsen TJ, Barker DJP. Patterns of growth among children who later develop type 2 diabetes or its risk factors. *Diabetologia* 2006;49:2853-8.
21. Knafo L, Chessex P, Rouleau T, Lavoie J-C. Association between hydrogen peroxide-dependent byproducts of ascorbic acid and increased hepatic acetyl-CoA carboxylase activity. *Clinical Chemistry* 2005;51:1462-1471.
22. Gerald D, Berra E, Frapart YM, et al. JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell* 2004;118:781-94.
23. Lin X, David CA, Donnelly JB, et al. A chemical genomics screen highlights the essential role of mitochondria in HIF-1 regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:174-9.

24. Lertratanangkoon K, Wu CJ, Savaraj N, Thomas ML. Alterations of DNA methylation by glutathione depletion. *Cancer Lett* 1997;120:149-56.
25. Gallou-Kabani C, Junien C. Nutritional epigenomics of metabolic syndrome: new perspective against the epidemic. *Diabetes* 2005;54:1899-906.
26. Hitchler MJ, Domann FE. An epigenetic perspective on the free radical theory of development. *Free Radic Biol Med* 2007;43:1023-36.
27. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* 2007;18:567-79.
28. Thomas JA. Oxidant defense in oxidative and nitrosative stress. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Baltimore, MD, U.S.A.: Lippincott Williams & Wilkins, 2006:685-694.
29. Patel RP, Moellering D, Murphy-Ullrich J, Jo H, Beckman JS, Darley-Usmar VM. Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1780-94.
30. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2004;44:275-95.
31. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984;219:1-14.
32. Miller RA, Buehner G, Chang Y, Harper JM, Sigler R, Smith-Wheelock M. Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell* 2005;4:119-25.
33. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)* 2006;30:400-18.
34. Folz RJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene. *Genomics* 1994;22:162-71.
35. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 1995;11:376-81.
36. Buettner GR, Ng CF, Wang M, Rodgers VG, Schafer FQ. A new paradigm: manganese superoxide dismutase influences the production of H₂O₂ in cells and thereby their biological state. *Free Radic Biol Med* 2006;41:1338-50.

37. Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic Res* 2001;34:325-36.
38. Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *Faseb J* 1999;13:1169-83.
39. Huang CS, Moore WR, Meister A. On the active site thiol of gamma-glutamylcysteine synthetase: relationships to catalysis, inhibition, and regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:2464-8.
40. Ookhtens M, Kaplowitz N. Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. *Semin Liver Dis* 1998;18:313-29.
41. Cai J, Huang ZZ, Lu SC. Differential regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy and light subunit gene expression. *Biochem J* 1997;326 (Pt 1):167-72.
42. Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;204:263-73.
43. Gallogly MM, Mieyal JJ. Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7:381-91.
44. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1287-312.
45. Pai EF, Schulz GE. The catalytic mechanism of glutathione reductase as derived from x-ray diffraction analyses of reaction intermediates. *J Biol Chem* 1983;258:1752-7.
46. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1191-212.
47. Thomas JA. Oxidant defense in oxidative and nitrosative stress. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Baltimore, MD, U.S.A.: Lippincott Williams & Wilkins, 2006:685-694.
48. Tateishi N, Higashi T, Naruse A, Nakashima K, Shiozaki H. Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine. *J Nutr* 1977;107:51-60.
49. Traber MG. Vitamin E. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Baltimore, MD, U.S.A.: Lippincott Williams & Wilkins, 2006:396-411.

50. Stahl W, Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med* 2003;24:345-51.
51. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:816-23.
52. Laborie S, Lavoie JC, Pineault M, Chessex P. Contribution of multivitamins, air, and light in the generation of peroxides in adult and neonatal parenteral nutrition solutions. *Ann Pharmacother* 2000;34:440-5.
53. Angelico M, Della Guardia P. Review article: hepatobiliary complications associated with total parenteral nutrition. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14 Suppl 2:54-7.
54. Lavoie JC, Kleiber N, Rouleau T, Nuyt A-M. The absence of light-protection of neonatal total parenteral nutrition (TPN) is associated to a higher lipogenesis in adult guinea pig. *Pediatric Academic Societies. Toronto: PAS* 182:7710, 2007.
55. Cox JH, Melbardis IM. Parenteral nutrition. In: Samour PQ, King K, eds. *Handbook of pediatric nutrition*. Sundbury, MA, U.S.A.: Jones and Bartlett Publishers, 2005:525-557.
56. Sendelbach LE, White CA, Howell S, Gregus Z, Klaassen CD. Effect of sulfhydryl-deficient diets on hepatic metallothionein, glutathione, and adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate (PAPS) levels in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990;102:259-67.
57. Stipanuk MH. Homocysteine, cysteine, and taurine. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Baltimore, MD, U.S.A.: Lippincott Williams & Wilkins, 2006:545-562.
58. Martin JA, Pereda J, Martinez-Lopez I, et al. Oxidative stress as a signal to up-regulate gamma-cystathionase in the fetal-to-neonatal transition in rats. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2007;53 Suppl:OL1010-7.
59. Jacobs RL, Stead LM, Brosnan ME, Brosnan JT. Hyperglucagonemia in rats results in decreased plasma homocysteine and increased flux through the transsulfuration pathway in liver. *J Biol Chem* 2001;276:43740-7.
60. Ratnam S, Maclean KN, Jacobs RL, Brosnan ME, Kraus JP, Brosnan JT. Hormonal regulation of cystathionine beta-synthase expression in liver. *J Biol Chem* 2002;277:42912-8.

61. Di BM, Wykes LJ, Ball RO, Pencharz PB. Dietary cysteine reduces the methionine requirement in men. *American Journal Clinical Nutrition* 2001;74:761-766.
62. Food and Nutrition Board, Medecine Io. Dietary references intakes: energy, carbohydrates, fibers, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. Washington, D.C.: National Academy Press, 2002.
63. Shoveller AK, Brunton JA, Pencharz PB, Ball RO. The methionine requirement is lower in neonatal piglets fed parenterally than in those fed enterally. *Journal of Nutrition* 2003;133:1390-1397.
64. Pencharz PB, Ball RO. Amino Acids for early growth and development. *Journal of Nutrition* 2004;134:1566S-1568S.
65. Brunton JA, Ball RO, Pencharz PB. Current total parenteral nutrition solutions for the neonate are inadequate. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2000;3:299-304.
66. Vina J, Vento M, Garcia-Sala F, et al. L-cysteine and glutathione metabolism are impaired in premature infants due to cystathionase deficiency. *Am J Clin Nutr* 1995;61:1067-9.
67. Martensson J, Finnstrom O. Metabolic effects of a human milk adapted formula on sulfur amino acid degradation in full-term infants. *Early Hum Dev* 1985;11:333-9.
68. Richie JP, Jr., Leutzinger Y, Parthasarathy S, Malloy V, Orentreich N, Zimmerman JA. Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats. *Faseb J* 1994;8:1302-7.
69. Stipanuk MH, Coloso RM, Garcia RA, Banks MF. Cysteine concentration regulates cysteine metabolism to glutathione, sulfate and taurine in rat hepatocytes. *J Nutr* 1992;122:420-7.
70. Burnell JN. Cysteinyl-tRNA Synthetase from *Phaseolus aureus*: Purification and Properties. *Plant Physiol* 1977;60:670-674.
71. Suberville C, Higuieret P, Taruoura D, Garcin H, Higuieret D. Glutathione deficiency and peripheral metabolism of thyroid hormones during dietary cysteine deprivation in rats. *Br J Nutr* 1988;59:451-6.
72. Garcin H, Suberville C, Higuieret P, Higuieret D. Changes in glutathione status and 3,5,3'-triiodothyronine action in livers of rats given cysteine-deficient diets. *Br J Nutr* 1989;61:301-7.

73. Burk RF, Levander OA. Selenium. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Baltimore, MD, U.S.A.: Lippincott Williams & Wilkins, 2006:312-325.
74. Stadtman TC. Selenocysteine. *Annu Rev Biochem* 1996;65:83-100.
75. Burk RF, Hill KE, Boeglin ME, Ebner FF, Chittum HS. Selenoprotein P associates with endothelial cells in rat tissues. *Histochem Cell Biol* 1997;108:11-5.
76. Bjornstedt M, Kumar S, Bjorkhem L, Spyrou G, Holmgren A. Selenium and the thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biomed Environ Sci* 1997;10:271-9.
77. Loflin J, Lopez N, Whanger PD, Kioussi C. Selenoprotein W during development and oxidative stress. *J Inorg Biochem* 2006;100:1679-84.
78. Low SC, Harney JW, Berry MJ. Cloning and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. *J Biol Chem* 1995;270:21659-64.
79. Brown KM, Arthur JR. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr* 2001;4:593-9.
80. Hill KE, Motley AK, Li X, May JM, Burk RF. Combined selenium and vitamin E deficiency causes fatal myopathy in guinea pigs. *The Journal of Nutrition* 2001;131:1798-1802.
81. Deagen JT, Butler JA, Beilstein MA, Whanger PD. Effects of dietary selenite, selenocystine and selenomethionine on selenocysteine lyase and glutathione peroxidase activities and on selenium levels in rat tissues. *J Nutr* 1987;117:91-8.
82. Bertinato J, Hidioglou N, Peace R, et al. Sparing effects of selenium and ascorbic acid on vitamin C and E in guinea pig tissues. *Nutr J* 2007;6:7.
83. Hill KE, Burk RF. Effect of selenium deficiency and vitamin E deficiency on glutathione metabolism in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1982;257:10668-72.
84. Uthus EO, Yokoi K, Davis CD. Selenium deficiency in Fisher-344 rats decreases plasma and tissue homocysteine concentrations and alters plasma homocysteine and cysteine redox status. *J Nutr* 2002;132:1122-8.
85. Cammack PM, Zwahlen BA, Christensen MJ. Selenium deficiency alters thyroid hormone metabolism in guinea pigs. *J Nutr* 1995;125:302-8.

86. Beech SG, Walker SW, Beckett GJ, Arthur JR, Nicol F, Lee D. Effect of selenium depletion on thyroidal type-I iodothyronine deiodinase activity in isolated human thyrocytes and rat thyroid and liver. *Analyst* 1995;120:827-31.
87. McCormick DB. Riboflavin. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Baltimore, MD, U.S.A.: Lippincott Williams & Wilkins, 2006:434-441.
88. Dym O, Eisenberg D. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci* 2001;10:1712-28.
89. Sauberlich HE, Judd JH, Jr., Nichoalds GE, Broquist HP, Darby WJ. Application of the erythrocyte glutathione reductase assay in evaluating riboflavin nutritional status in a high school student population. *Am J Clin Nutr* 1972;25:756-62.
90. Toh SY, Thompson GW, Basu TK. Riboflavin status of the elderly: dietary intake and FAD-stimulating effect on erythrocyte glutathione reductase coefficients. *Eur J Clin Nutr* 1994;48:654-9.
91. Prasad AP, Lakshmi AV, Bamji MS. Interpretation of erythrocyte glutathione reductase activation test values for assessing riboflavin status. *Eur J Clin Nutr* 1992;46:753-8.
92. Mataix J, Aranda P, Sanchez C, Montellano MA, Planells E, Llopis J. Assessment of thiamin (vitamin B1) and riboflavin (vitamin B2) status in an adult Mediterranean population. *Br J Nutr* 2003;90:661-6.
93. Prentice AM, Bates CJ. A biochemical evaluation of the erythrocyte glutathione reductase (EC 1.6.4.2) test for riboflavin status. 2. Dose-response relationships in chronic marginal deficiency. *Br J Nutr* 1981;45:53-65.
94. Taniguchi M, Hara T. Effects of riboflavin and selenium deficiencies on glutathione and its relating enzyme activities with respect to lipid peroxide content of rat livers. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1983;29:283-92.
95. Werner R, Manthey KC, Griffin JB, Zemleni J. HepG2 cells develop signs of riboflavin deficiency within 4 days of culture in riboflavin-deficient medium. *J Nutr Biochem* 2005;16:617-24.
96. Turnlund JR. Copper. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Baltimore, MD, U.S.A.: Lippincott, Williams & Wilkins, 2006:286-299.

97. Turnlund JR, Scott KC, Peiffer GL, et al. Copper status of young men consuming a low-copper diet. *Am J Clin Nutr* 1997;65:72-8.
98. Uauy R, Castillo-Duran C, Fisberg M, Fernandez N, Valenzuela A. Red cell superoxide dismutase activity as an index of human copper nutrition. *J Nutr* 1985;115:1650-5.
99. Turnlund JR. Copper nutriture, bioavailability, and the influence of dietary factors. *J Am Diet Assoc* 1988;88:303-8.
100. King JC, Cousins RJ. Zinc. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Baltimore, MD, U.S.A.: Lippincott Williams & Wilkins, 2006:271-285.
101. King JC. Assessment of zinc status. *J Nutr* 1990;120 Suppl 11:1474-9.
102. Buchman AL. Manganese. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Baltimore, MD, U.S.A.: Lippincott Williams & Wilkins, 2006:326-331.
103. Milne DB, Sims RL, Ralston NV. Manganese content of the cellular components of blood. *Clin Chem* 1990;36:450-2.
104. Davis CD, Greger JL. Longitudinal changes of manganese-dependent superoxide dismutase and other indexes of manganese and iron status in women. *Am J Clin Nutr* 1992;55:747-52.
105. Davis CD, Ney DM, Greger JL. Manganese, iron and lipid interactions in rats. *J Nutr* 1990;120:507-13.
106. Lai CC, Huang WH, Askari A, et al. Differential regulation of superoxide dismutase in copper-deficient rat organs. *Free Radic Biol Med* 1994;16:613-20.
107. Chao PY, Allen KG. Glutathione production in copper-deficient isolated rat hepatocytes. *Free Radic Biol Med* 1992;12:145-50.
108. Chen Y, Saari JT, Kang YJ. Expression of gamma-glutamylcysteine synthetase in the liver of copper-deficient rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;210:102-6.
109. Prohaska JR. Changes in Cu,Zn-superoxide dismutase, cytochrome c oxidase, glutathione peroxidase and glutathione transferase activities in copper-deficient mice and rats. *J Nutr* 1991;121:355-63.
110. al-Othman AA, Rosenstein F, Lei KY. Pool size and concentration of plasma cholesterol are increased and tissue copper levels are reduced during early stages of copper deficiency in rats. *J Nutr* 1994;124:628-35.

111. al-Othman AA, Rosenstein F, Lei KY. Copper deficiency increases in vivo hepatic synthesis of fatty acids, triacylglycerols, and phospholipids in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993;204:97-103.
112. Jing MY, Sun JY, Zi NT, Sun W, Qian LC, Weng XY. Effects of zinc on hepatic antioxidant systems and the mRNA expression levels assayed by cDNA microarrays in rats. *Ann Nutr Metab* 2007;51:345-51.
113. Sun JY, Jing MY, Weng XY, et al. Effects of dietary zinc levels on the activities of enzymes, weights of organs, and the concentrations of zinc and copper in growing rats. *Biol Trace Elem Res* 2005;107:153-65.
114. Borrello S, De Leo ME, Wohlrab H, Galeotti T. Manganese deficiency and transcriptional regulation of mitochondrial superoxide dismutase in hepatomas. *FEBS Lett* 1992;310:249-54.
115. Borrello S, De Leo ME, Galeotti T. Transcriptional regulation of MnSOD by manganese in the liver of manganese-deficient mice and during rat development. *Biochem Int* 1992;28:595-601.
116. Thompson KH, Godin DV, Lee M. Tissue antioxidant status in streptozotocin-induced diabetes in rats. Effects of dietary manganese deficiency. *Biol Trace Elem Res* 1992;35:213-24.
117. Everson GJ, Shrader RE. Abnormal glucose tolerance in manganese-deficient guinea pigs. *J Nutr* 1968;94:89-94.
118. Baly DL, Curry DL, Keen CL, Hurley LS. Effect of manganese deficiency on insulin secretion and carbohydrate homeostasis in rats. *J Nutr* 1984;114:1438-46.
119. Friedman BJ, Freeland-Graves JH, Bales CW, et al. Manganese balance and clinical observations in young men fed a manganese-deficient diet. *J Nutr* 1987;117:133-43.
120. Wood RJ, Ronnenberg AG. Iron. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Baltimore, MD, U.S.A.: Lippincott Williams & Wilkins, 2006:248-270.
121. Klempa KL, Willis WT, Chengson R, Dallman PR, Brooks GA. Iron deficiency decreases gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes. *J Appl Physiol* 1989;67:1868-72.
122. Brooks GA, Henderson SA, Dallman PR. Increased glucose dependence in resting, iron-deficient rats. *Am J Physiol* 1987;253:E461-6.

123. Levine M, Katz A, Padayatty SJ. Vitamin C. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Baltimore, MD, U.S.A.: Lippincott Williams & Wilkins, 2006:507-524.
124. Lu H, Dalgard CL, Mohyeldin A, McFate T, Tait AS, Verma A. Reversible inactivation of HIF-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal HIF-1. *J Biol Chem* 2005;280:41928-39.
125. Knowles HJ, Raval RR, Harris AL, Ratcliffe PJ. Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells. *Cancer Res* 2003;63:1764-8.
126. Ross AC. Vitamin A and carotenoids. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Baltimore, MD, U.S.A.: Lippincott Williams & Wilkins, 2006:351-375.
127. Zachman RD. Retinol (vitamin A) and the neonate: special problems of the human premature infant. *Am J Clin Nutr* 1989;50:413-24.
128. Lykkesfeldt J, Trueba GP, Poulsen HE, Christen S. Vitamin C deficiency in weanling guinea pigs: differential expression of oxidative stress and DNA repair in liver and brain. *Br J Nutr* 2007;98:1116-9.
129. Burk RF, Christensen JM, Maguire MJ, et al. A combined deficiency of vitamins E and C causes severe central nervous system damage in guinea pigs. *The Journal of Nutrition* 2006;136:1576-1581.
130. Hill KE, Montine TJ, Motley AK, Li X, May JM, Burk RF. Combined deficiency of vitamins E and C causes paralysis and death in guinea pigs. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1484-8.
131. Klover PJ, Mooney RA. Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:753-8.
132. Hardie DG, Hawley SA. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays* 2001;23:1112-9.
133. Olson AL, Pessin JE. Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu Rev Nutr* 1996;16:235-56.
134. Thorens B. Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. *Am J Physiol* 1996;270:G541-53.
135. Eisenberg ML, Maker AV, Slezak LA, et al. Insulin receptor (IR) and glucose transporter 2 (GLUT2) proteins form a complex on the rat hepatocyte membrane. *Cell Physiol Biochem* 2005;15:51-8.

136. Weil J-H, Montreuil J. Métabolisme des glucides. In: Weil, ed. Biochimie générale. 9 ed. Paris: Dunod, 2001:215-262.
137. Palmieri F. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Eur J Physiol* 2004;447:689-709.
138. Madan A, Varma S, Cohen HJ. Developmental stage-specific expression of the alpha and beta subunits of the HIF-1 protein in the mouse and human fetus. *Mol Genet Metab* 2002;75:244-9.
139. Kietzmann T, Cornesse Y, Brechtel K, Modaressi S, Jungermann K. Perivenous expression of the mRNA of the three hypoxia-inducible factor alpha-subunits, HIF1alpha, HIF2alpha and HIF3alpha, in rat liver. *Biochem J* 2001;354:531-7.
140. Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, et al. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *Faseb J* 2001;15:2445-53.
141. Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L. Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5667-72.
142. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1994;269:23757-63.
143. Bartrons R, Caro J. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *J Bioenerg Biomembr* 2007;39:223-9.
144. Tong L. Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:1784-803.
145. Tong L, Harwood HJ, Jr. Acetyl-coenzyme A carboxylases: versatile targets for drug discovery. *J Cell Biochem* 2006;99:1476-88.
146. Foretz M, Taleux N, Guigas B, et al. [Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases]. *Med Sci (Paris)* 2006;22:381-8.
147. Viollet B, Foretz M, Guigas B, et al. Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J Physiol* 2006;574:41-53.

148. Brownsey RW, Boone AN, Elliott JE, Kulpa JE, Lee WM. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans* 2006;34:223-7.
149. Travers MT, Barber MC. Acetyl-CoA carboxylase- α : Gene structure-function relationships. *J Anim Science* 2001;79:E136-E143.
150. Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D, Witters LA. Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol* 1999;276:E1-E18.
151. Stoeckman AK, Towle HC. The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression. *J Biol Chem* 2002;277:27029-35.
152. Travers MT, Vallance AJ, Clegg RA, Thomson R, Price NT, Barber MC. Characterisation of an N-terminal variant of acetyl-CoA carboxylase- α : expression in human tissues and evolutionary aspects. *Biochim Biophys Acta* 2003;1634:97-106.
153. Gaussin V, Hue L, Stalmans W, Bollen M. Activation of hepatic acetyl-CoA carboxylase by glutamate and Mg^{2+} is mediated by protein phosphatase-2A. *Biochem. Journal* 1996;316:217-224.
154. Boone AN, Chans A, Kulpa JE, Brownsey RW. Bimodal activation of acetyl-CoA carboxylase by glutamate. *Journal of biological chemistry* 2000;275:10819-10825.
155. Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett* 2003;546:113-20.
156. Hawley SA, Davison M, Woods A, et al. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1996;271:27879-87.
157. Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem* 1995;229:558-65.
158. Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 2004;117:5479-87.
159. Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res* 2007;100:328-41.
160. Kemp BE, Mitchelhill KI, Stapleton D, Michell BJ, Chen ZP, Witters LA. Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends Biochem Sci* 1999;24:22-5.

161. Fryer LG, Fougelle F, Barnes K, Baldwin SA, Woods A, Carling D. Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells. *Biochem J* 2002;363:167-74.
162. Hardie DG. AMPK and Raptor: matching cell growth to energy supply. *Mol Cell* 2008;30:263-5.
163. Leonard AE, Pereira SL, Sprecher H, Huang YS. Elongation of long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* 2004;43:36-54.
164. Jones PJH, Kubow S. Lipids, sterols, and their metabolites. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Baltimore, MD, U.S.A.: Lippincott Williams & Wilkins, 2006:92-122.
165. Weil J-H, Rebel G. Métabolisme des lipides. In: Weil, ed. *Biochimie générale*. 9 ed. Paris: Dunod, 2001:285-328.
166. Leitch CA, Jones PJ. Measurement of human lipogenesis using deuterium incorporation. *J Lipid Res* 1993;34:157-63.
167. Vedala A, Wang W, Neese RA, Christiansen MP, Hellerstein MK. Delayed secretory pathway contributions to VLDL-triglycerides from plasma NEFA, diet, and de novo lipogenesis in humans. *J Lipid Res* 2006;47:2562-74.
168. Lucas A. Long-term programming effects of early nutrition -- implications for the preterm infant. *J Perinatol* 2005;25 Suppl 2:S2-6.
169. Lucas A. Programming by early nutrition: an experimental approach. *J Nutr* 1998;128:401S-406S.
170. Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr* 1999;69:179-97.
171. Singhal A, Cole TJ, Lucas A. Early nutrition in preterm infants and later blood pressure: two cohorts after randomised trials. *Lancet* 2001;357:413-9.
172. Singhal A, Fewtrell M, Cole TJ, Lucas A. Low nutrient intake and early growth for later insulin resistance in adolescents born preterm. *Lancet* 2003;361:1089-97.
173. Singhal A, Cole TJ, Fewtrell M, Lucas A. Breastmilk feeding and lipoprotein profile in adolescents born preterm: follow-up of a prospective randomised study. *Lancet* 2004;363:1571-8.
174. Luo ZC, Fraser WD, Julien P, et al. Tracing the origins of "fetal origins" of adult diseases: programming by oxidative stress? *Med Hypotheses* 2006;66:38-44.

175. Cambonie G, Comte B, Yzydorczyk C, et al. Antenatal antioxidant prevents adult hypertension, vascular dysfunction, and microvascular rarefaction associated with in utero exposure to a low-protein diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;292:R1236-45.
176. Nuyt AM. Mechanisms underlying developmental programming of elevated blood pressure and vascular dysfunction: evidence from human studies and experimental animal models. *Clin Sci (Lond)* 2008;114:1-17.
177. Valinluck V, Tsai HH, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res* 2004;32:4100-8.
178. Lavoie JC, Kleiber N, Nuyt AM, Rouleau T. Oxidative stress early in life induces modification of glutathione status and hepatic lipid metabolism at adulthood guinea pig. SFRBM's 13th annual meeting. Denver, Colorado, U.S.A.: *Free Rad Biol Med* 41(Supp 1): S24:43, november 2006.
179. Turcot V, Kleiber N, Nuyt AM, Rouleau T, Lavoie JC. La nutrition parentérale néonatale perturbe le métabolisme lipidique à l'âge adulte. 8e réunion annuelle Société québécoise de lipidologie, de nutrition et de métabolisme. Sheraton Laval Hôtel, Laval, QC, Canada: *Médecine science* 17:72, mai 2007.
180. Lavoie JC, Kleiber N, Rouleau T, Nuyt A-M. The absence of light-protection of neonatal total parenteral nutrition (TPN) is associated to a higher lipogenesis in adult guinea pig. Pediatric Academic Societies annual meeting. Toronto, ON, Canada: PAS 182:7710, mai 2007.
181. Rouleau T, Kleiber N, Nuyt AM, Lavoie JC. TPN given during the neonatal period has critical consequences for energy metabolism in later life. Pediatric Academic Societies and Asian Society for pediatric research joint meeting. Honolulu, Hawaii, U.S.A.: PAS 91:3773, mai 2008.
182. Fernandez ML, Volek JS. Guinea pigs: a suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation. *Nutr Metab (Lond)* 2006;3:17.
183. Fernandez ML. Guinea pigs as models for cholesterol and lipoprotein metabolism. *J Nutr* 2001;131:10-20.
184. Omaye ST, Turnbull JD, Sauberlich HE. Selected methods for the determination of ascorbic acid in animals cells, tissues and fluids. *Methods in enzymology* 1979;62.

185. Lavoie J-C, Rouleau T, Tsopmo A, Friel J, Chessex P. Influence of lung oxidant and antioxidant status on alveolarization: role of light-exposed total parenteral nutrition. *Free Radical Biology Medicine* 2008;Article in press:10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.018.
186. Folch J, Lees M, Stanley SGH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal Biological Chemistry* 1956;226:497-509.
187. Makinde A-O, Gamble J, Lopaschuk GD. Upregulation of 5'-AMP-Activated protein kinase is responsible for the increase in myocardial fatty acid oxidation rates following birth in the newborn rabbit. *Circulation research* 1997;80:482-489.
188. Kudo N, Barr AJ, Barr RL, Desal 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. *Journal of biological chemistry* 1995;270:17513-17520.
189. Hardy DG. Regulation of fatty acid and cholesterol metabolism by the AMP-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Acta* 1992;1123:231-238.
190. Garcia-Alfonso C, Martinez-Galisteo E, Llobell A, Barcena JA, Lopez-Barea J. Regulation of horse-liver glutathione reductase. *Int J Biochem* 1993;25:513-20.
191. Pogribny IP, Ross SA, Wise C, et al. Irreversible global DNA hypomethylation as a key step in hepatocarcinogenesis induced by dietary methyl deficiency. *Mutat Res* 2006;593:80-7.
192. Steinmetz KL, Pogribny IP, James SJ, Pitot HC. Hypomethylation of the rat glutathione S-transferase pi (GSTP) promoter region isolated from methyl-deficient livers and GSTP-positive liver neoplasms. *Carcinogenesis* 1998;19:1487-94.
193. Rao RK, Clayton LW. Regulation of protein phosphatase 2A by hydrogen peroxide and glutathionylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:610-6.
194. Mahadev K, Zilbering A, Zhu L, Goldstein BJ. Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *J Biol Chem* 2001;276:21938-42.
195. Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem Pharmacol* 2002;64:1057-64.

196. Keskin M, Kurtoglu S, Kendirci M, Atabek ME, Yazici C. Homeostasis model assessment is more reliable than the fasting glucose/insulin ratio and quantitative insulin sensitivity check index for assessing insulin resistance among obese children and adolescents. *Pediatrics* 2005;115:e500-3.
197. Zimmerman AE, Yip CC. Guinea pig insulin. I. Purification and physical properties. *J Biol Chem* 1974;249:4021-5.
198. Zimmerman AE, Moule ML, Yip CC. Guinea pig insulin. II. Biological activity. *J Biol Chem* 1974;249:4026-9.
199. Kind KL, Clifton PM, Grant PA, et al. Effect of maternal feed restriction during pregnancy on glucose tolerance in the adult guinea pig. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284:R140-52.
200. Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 1999;283:1544-8.
201. Rao RK, Li L, Baker RD, Baker SS, Gupta A. Glutathione oxidation and PTPase inhibition by hydrogen peroxide in Caco-2 cell monolayer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G332-40.
202. Shimizu S, Ugi S, Maegawa H, et al. Protein-tyrosine phosphatase 1B as new activator for hepatic lipogenesis via sterol regulatory element-binding protein-1 gene expression. *J Biol Chem* 2003;278:43095-101.
203. Sinclair KD, Allegrucci C, Singh R, et al. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:19351-6.
204. Pamplona R, Barja G. Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionine connection. *Biochim Biophys Acta* 2006;1757:496-508.
205. Ensign WY, McNamara DJ, Fernandez ML. Exercise improves plasma lipid profiles and modifies lipoprotein composition in guinea pigs. *J Nutr Biochem* 2002;13:747-753.
206. Aggarwal D, West KL, Zern TL, Shrestha S, Vergara-Jimenez M, Fernandez ML. JTT-130, a microsomal triglyceride transfer protein (MTP) inhibitor lowers plasma triglycerides and LDL cholesterol concentrations without increasing hepatic triglycerides in guinea pigs. *BMC Cardiovasc Disord* 2005;5:30.

207. Jankov RP, Negus A, Tanswell AK. Antioxidants as therapy in the newborn: some words of caution. *Pediatr Res* 2001;50:681-7.
208. Kemp M, Go YM, Jones DP. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. *Free Radic Biol Med* 2008;44:921-37.

ANNEXE I

Description de la diète restreinte



2508 Easton / Bethlehem, Pennsylvania 18017
Within 610 Area Code: 868-7701, FAX -868-5170
Outside 610 Area Code: 800-275-3938
FAX: 800-329-3938
E-Mail Address: dyets@enter.net

DYET# 556254

Custom Hospital St. Justine L-Amino Acid Defined Guinea Pig Diet

Table with 2 columns: Ingredient and gm/Kg. Lists amino acids (L-Alanine to L-Valine) and other ingredients (Sucrose, Cornstarch, Dyetrose, Cellulose, Guar Gum, Tocopherol Stripped Corn Oil, tBHQ, Salt Mix #254752, Sodium Bicarbonate, Vitamin Mix #356751, Choline Bitartrate) with their respective weights. Total L-AA* is 180.47 gm/Kg and total is 1000.00 gm/Kg.

Frank J. Gianni, Charles River Labs, 12/15/1993
Valerie Turcot, Hospital St. Justine, June 11, 2007

*L-Glutamic Acid added to balance



2508 Easton Avenue, Bethlehem, Pennsylvania 18017

Within 610 Area Code: 868-7701, FAX -868-5170

Outside 610 Area Code: 800-275-3938

FAX: 800-329-3938

E-Mail Address: dyets@enter.net

REVISED

Dyets #254752

Custom Hospital St. Justine Mineral Mix for Custom Guinea Pig Diet
(use at 75 g/kg of diet)

Ingredient	grams/kg
Calcium Carbonate	65.56
Calcium Phosphate, dibasic	310
Sodium Chloride	118
Potassium Citrate	325
Potassium Sulfate	89.5
Magnesium Oxide	59
Manganous Carbonate	0
Ferric Citrate, U.S.P.	0
Zinc Carbonate	0
Cobalt Carbonate	0.03
Cupric Carbonate	0
Potassium Iodide	0.03
Chromium Potassium Sulfate	0.07
Sucrose, finely powdered	32.81
	1000.00

*Dyets, Inc., Bethlehem, PA, United States of America
Valerie Turcot, Hospital St. Justine, June 11, 2007*



2508 Easton A Bethlehem, Pennsylvania 18017
 Within 610 Area Code: 868-7701, FAX -868-5170
 Outside 610 Area Code: 800-275-3938
 FAX: 800-329-3938
 E-Mail Address: dyets@center.net

DYET# 356751

Custom NRC Vitamin Mixture for Guinea Pigs
 Without Riboflavin, Vitamin E or Ascorbic Acid
 (Use at 10 g/kg of Diet)

Ingredient	grams/kg
Thiamin HCl	0.3
Riboflavin	0
Pyridoxine HCl	0.4
Niacin	1.1
Calcium Pantothenate	2.2
Folic Acid	0.5
Biotin	0.04
Vitamin B12 (0.1%)	1.2
Vitamin A Palmitate (500,000 U/g)	5
Vitamin D3 (400,000 U/g)	0.3
Vitamin E Acetate (500 U/g)	0
Menadione Sodium Bisulfite	1
Stay C-35 (35% Vitamin C)	0
Sucrose, finely powdered	987.96
	1000.00

Frank J. Gianni, Charles River Laboratories, 12.15/1993
Valerie Turcot, Hospital St. Justine, June 11, 2007

ANNEXE II

Description de la diète standard

2041 Teklad Global High Fiber Guinea Pig Diet



Product Description—2041 Teklad Global High Fiber Guinea Pig Diet is designed and manufactured with high quality ingredients. 2041 is a fixed formula diet, containing a minimum of 4% fat and a maximum of 16% crude fiber, designed to meet the nutritional needs for all stages of the guinea pig's life cycle. High fiber content of this diet eliminates the need to supplement diet with hay. Contains added stabilized vitamin C (L-ascorbyl-2-polyphosphate) extending the guaranteed shelf-life to 6 months from date of manufacture. Diet 2041 is available certified (2041C) and irradiated (2941).

Ingredients—Dehydrated alfalfa meal, wheat middlings, dehulled soybean meal, ground corn, soybean hulls, ground wheat, soybean oil, dicalcium phosphate, iodized salt, L-ascorbyl-2-polyphosphate, niacin, vitamin A acetate, biotin, pyridoxine hydrochloride, thiamine mononitrate, vitamin D3 supplement, folic acid, menadione sodium bisulfite complex (source of vitamin K activity), vitamin E supplement, vitamin B12 supplement, riboflavin, calcium pantothenate, calcium carbonate, ferrous sulfate, magnesium oxide, manganese oxide, zinc oxide, copper sulfate, calcium iodate, cobalt carbonate, chromium potassium sulfate, kaolin.

Macronutrients*

Crude Protein	%	17.9
Crude Oil (Fat)	%	4.5
Crude Fiber	%	14.7
Ash	%	8.3
Carbohydrate (available)	%	26.3
Starch	%	18.8
Sugar	%	7.5
Digestible Energy [†]	Kcal/g (MJ/kg)	2.5(10.5)
Metabolizable Energy [†]	Kcal/g (MJ/kg)	2.4(10.0)
Calories from Protein*	%	33
Calories from Fat*	%	19
Calories from Carbohydrate*	%	48

Minerals*

Calcium	%	1.01
Phosphorus	%	0.68
Sodium	%	0.39
Potassium	%	1.45
Chloride	%	0.81
Magnesium	%	0.27
Zinc	mg/kg	86.0
Manganese	mg/kg	134.0
Copper	mg/kg	18.0
Iodine (added)	mg/kg	14.0
Iron	mg/kg	265.0
Selenium	mg/kg	0.2
Cobalt	mg/kg	0.6
Chromium	mg/kg	0.5

Amino Acids*

Aspartic Acid	%	1.78
Glutamic Acid	%	2.66
Alanine	%	0.89
Glycine	%	0.97
Threonine	%	0.77
Proline	%	1.17
Serine	%	0.89
Leucine	%	1.37
Isoleucine	%	0.87
Valine	%	1.05
Phenylalanine	%	0.95
Tyrosine	%	0.66
Phe + Tyr	%	1.60
Methionine	%	0.29
Cystine	%	0.27
Met + Cyst	%	0.56
Lysine	%	0.97
Histidine	%	0.47
Arginine	%	1.17
Tryptophan	%	0.35
Available Lysine	%	0.79

Vitamins*

Vitamin A	iu/g	16.30
Retinol	mg/kg	4.90
Vitamin D ₃	iu/g	1.00
Cholecalciferol	ug/kg	24.60
Vitamin E (α-tocopherol)	mg/kg	93.80
Vitamin K ₃ (menadione)	mg/kg	31.20
Vitamin B ₁ (thiamine)	mg/kg	12.60
Vitamin B ₂ (riboflavin)	mg/kg	13.80
Avail. Niacin (nicotinic acid)	mg/kg	50.40
Vitamin B ₆ (pyridoxine)	mg/kg	21.10
Pantothenic Acid	mg/kg	29.60
Vitamin B ₁₂ (cyanocobalamin)	ug/kg	0.05
Avail. Biotin	mg/kg	0.37
Folate	mg/kg	3.80
Vitamin C	mg/kg	1050.00
Choline	mg/kg	1146.00
B Carotene	mg/kg	46.18
Inositol	mg/kg	1044.00

Fatty Acids*

C16:0 Palmitic	g/kg	6.6
C18:0 Stearic	g/kg	1.2
C18:1ω9 Oleic	g/kg	7.6
C18:2ω6 Linoleic	g/kg	20.5
C18:3ω3 Linolenic	g/kg	5.5
Total Saturated	g/kg	8.8
Total Monounsaturated	g/kg	8.0
Total Polyunsaturated	g/kg	26.2
Cholesterol	mg/kg	—

*Calculations performed using values of 4 kcal/g for protein and carbohydrate and 9 kcal/g for oil (fat).

[†] **Digestible Energy (DE)** is the total (gross) amount of energy in the diet minus the energy eliminated in the feces. It accounts for energy contained in the indigestible portion of the diet. Of the digestible energy, some is lost as a result of various metabolic processes in the urine and sometimes in gases from the digestive tract. The remaining energy in the body is available to support metabolism and is known as the **Metabolizable Energy (ME)**. This value more accurately reflects the usable energy contained in the diet.

*Nutrient levels are calculated from raw material data and are adjusted to 10% moisture level in the diet. Nutrient values may vary due to the inherent variability in the natural ingredients and from laboratory analysis.

Standard Product Form: Pellet