

Université de Montréal

**Contamination des solutions d'hyper-alimentation
intraveineuses (HAIV) néonatales, effet de
l'ascorbylperoxyde au foie**

Par

François Côté

Programme de Sciences biomédicales

Faculté de Médecine

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

Décembre, 2008

© François Côté, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Contamination des solutions d'hyper-alimentation
intraveineuses (HAIV) néonatales, effet de
l'ascorbylperoxyde au foie

présenté par :

François Côté

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Mounib Elchebly : Président-rapporteur

Dr Jean-Claude Lavoie : Directeur de recherche

Dr Blandine Comte : Membre du jury

Résumé

Introduction : Chez les nouveau-nés prématurés, l'hyper-alimentation intraveineuse (HAIV) contribue à leur survie, mais elle est aussi une source importante de molécules oxydantes. L'absence d'une protection adéquate contre la lumière ambiante génère *in vitro*, via la photo-excitation de la riboflavine, du H₂O₂, des peroxydes organiques et un dérivé peroxydé de la vitamine C, l'ascorbylperoxyde (AscOOH). Plusieurs données du laboratoire associent l'infusion d'HAIV à des désordres lipidiques dans notre modèle animal. L'**hypothèse** est donc que l'AscOOH a un pouvoir oxydant et est responsable de certains des effets biologiques observés. Mes **objectifs** sont les suivants : 1) développer une méthode de dosage de l'AscOOH; 2) démontrer, à l'aide du modèle animal bien établi au laboratoire, des relations entre la concentration tissulaire de cette molécule et des paramètres métaboliques et l'état redox au foie et dans la circulation; et 3) confirmer l'effet physiologique de l'AscOOH dans un modèle cellulaire. **Méthode :** Différents étalons internes potentiels ont été testés pour le dosage de l'AscOOH par spectrométrie de masse après séparation sur HPLC (LC-MS). Les phases mobiles et conditions chromatographiques ont été optimisées. Pour l'objectif 2, des cobayes de 3 jours de vie (n=11) ont reçu par voie intraveineuse une dose d'AscOOH (entre 0 et 3,3mM). Les animaux ont été sacrifiés au 4e jour de traitement pour le prélèvement de tissus. Les concentrations tissulaires d'AscOOH ont été déterminées au LC-MS. La triglycémie et la cholestérolémie ont été mesurées à l'aide d'un kit commercial par spectrophotométrie. Le glutathion oxydé et réduit ont été mesurés par électrophorèse capillaire. Les relations linéaires obtenues sont exprimées par le ratio des carrés (r²), et traitées par ANOVA. **Résultats :** La validation du dosage de l'AscOOH par LC-MS a été réalisée. Chez les animaux, la concentration urinaire d'AscOOH par créatinine corrèle positivement avec la dose reçue, négativement avec la lipidémie, et négativement avec le redox sanguin et érythrocytaire, indiquant un milieu moins oxydé. **Conclusion :** La concentration urinaire d'AscOOH peut donc être un reflet de l'oxydation de l'HAIV en clinique. Nos données chez l'animal suggèrent une interaction de l'AscOOH avec le métabolisme hépatique produisant une chute de la concentration plasmatique de cholestérol et de triglycérides. Le modèle cellulaire n'a pas permis d'élucider le mécanisme moléculaire de l'action de l'AscOOH sur le métabolisme.

MOTS CLÉS : nutrition parentérale, vitamine C, métabolisme lipidique, foie, néonatal, cobaye, riboflavine, photochimie, ascorbylperoxyde.

Abstract

Introduction: Intravenous hyperalimentation (IVHA) often contributes to the survival of preterm newborns, but it is also an important source of oxidizing molecules. The lack of adequate protection from ambient light generates, *in vitro*, through the photo-excitation of riboflavin, H₂O₂, organic peroxides and a peroxidated derivative of vitamin C: ascorbylperoxide (AscOOH). Certain data from our laboratory linked the infusion of IVHA to lipid disorders in our animal model. The **hypothesis** is that AscOOH is an oxidant that is responsible for some of the biological effects observed. My **objectives** are: 1) to develop a method for quantitation of AscOOH, 2) to demonstrate, using the guinea pig model used by our laboratory, relations between the tissue concentration of this molecule and metabolic and redox parameters in the liver and plasma, and 3) to confirm the physiological effect of AscOOH in a cell culture model. **Method:** Different promising internal standards were tested for AscOOH quantitation by mass spectrometry after HPLC separation (LC-MS). Mobile phases and chromatography conditions have been optimized. For objective #2, 3 days old guinea pig pups (n = 11) received an intravenous dose of AscOOH (between 0 and 3.3mM). Animals were sacrificed on the 4th day of treatment for tissue gathering. Tissues AscOOH concentrations were determined by LC-MS. The triglyceride and cholesterol levels were measured by spectrophotometry using a commercial kit. The oxidized and reduced glutathione were measured by capillary electrophoresis. The linear relations obtained are expressed by the square of the correlation coefficient (r^2), and processed by ANOVA. **Results:** The validation of the LC-MS method for AscOOH quantification has been achieved. In animals, the concentration of urinary AscOOH by creatinine correlates positively with the dose received, negatively with blood lipids, and negatively with blood and erythrocyte redox, indicating a less oxidized environment. **Conclusion:** The urinary AscOOH concentration may be a good indicator of the oxidation state of clinical IVHA. Our data in animals suggest an interaction between AscOOH and liver metabolism producing a drop in plasma concentration of cholesterol and triglycerides. The cell model was not able to clarify the molecular mechanism of AscOOH action on metabolism.

KEY WORDS: parenteral nutrition, vitamin C, lipid metabolism, liver, neonatal, guinea pig, riboflavin, photochemistry, ascorbylperoxide.

Table des matières

PAGE DE PRÉSENTATION	I
IDENTIFICATION DU JURY.....	II
RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES TABLEAUX	XII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XIII
REMERCIEMENTS	XV
1. INTRODUCTION.....	1
1.1. LE PARADOXE DE LA NUTRITION PARENTÉRALE.....	2
1.1.1. <i>Un traitement indispensable aux prématurés et aux bébés de faible poids à la naissance</i>	2
1.1.2. <i>Problèmes reliés au contenu des solutions d’HAIV.....</i>	3
1.1.2.1. Nutriments et posologie	3
1.1.2.2. Considérations chimiques	6
1.1.3. <i>Les complications associées à l’HAIV néonatale.....</i>	8
1.1.4. <i>Programmation fœtale et néonatale.....</i>	10
1.1.4.1. Définition et exemple.....	10
1.1.4.2. Mécanismes proposés de la programmation.....	11
1.2. CHARGE OXYDANTE DE LA NUTRITION PARENTÉRALE	12
1.2.1. <i>Le peroxyde d’hydrogène.....</i>	12
1.2.2. <i>Peroxydation lipidique et produits générés</i>	13
1.2.3. <i>L’ascorbylperoxyde</i>	14
1.2.3.1. La vitamine C.....	15
1.2.3.2. La riboflavine.....	19
1.2.3.3. Photo-oxydation de l’ascorbate par la riboflavine.....	21
1.2.4. <i>Espèces redox et produits de dégradation : leurs rôles physiologiques</i>	27
1.3. L’HOMÉOSTASIE REDOX CHEZ L’HUMAIN	30
1.3.1. <i>Les oxydants et antioxydants in vivo.....</i>	30

1.3.2.	<i>L'effet de la prématurité sur la défense antioxydante</i>	33
1.4.	VOIES MÉTABOLIQUES	34
1.4.1.	<i>Aperçu du métabolisme énergétique hépatique étudié</i>	34
1.5.	LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE	37
1.5.1.	<i>Principes</i>	37
1.5.2.	<i>Utilisation pour la vitamine C et ses dérivés</i>	39
2.	HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	41
2.1.	HYPOTHÈSE	41
2.2.	OBJECTIFS	41
2.2.1.	<i>Objectif principal</i>	41
2.2.2.	<i>Objectifs secondaires</i>	42
3.	MATÉRIEL ET MÉTHODES	43
3.1.	MATÉRIEL.....	43
3.2.	MISE AU POINT DU DOSAGE DE L'ASCORBYLPEROXYDE.....	45
3.2.1.	<i>Génération d'ascorbylperoxyde in vitro</i>	45
3.2.2.	<i>Spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (LC-MS)</i>	46
3.2.2.1.	Méthode de spectrométrie de masse	46
3.2.2.2.	Méthode chromatographique.....	47
3.2.2.3.	Traitement des échantillons.....	48
3.2.2.4.	Quantification (molécule étalon)	49
3.2.3.	<i>Stabilité et caractérisation de l'AscOOH</i>	50
3.3.	PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX <i>IN VIVO</i>	51
3.3.1.	<i>Quantification de l'ascorbylperoxyde dans l'urine d'enfants nés prématurément sous HAIV ± lumière</i>	51
3.3.2.	<i>Modèle animal</i>	51
3.3.3.	<i>Quantification de l'ascorbylperoxyde dans l'urine de cochons d'Inde néonataux sous HAIV ± lumière</i>	53
3.3.4.	<i>Effet de l'infusion d'AscOOH chez le cochon d'Inde néonatal</i>	54
3.4.	PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX <i>IN VITRO</i>	54
3.4.1.	<i>Effet de l'incubation d'AscOOH sur la concentration en glutathion et l'entrée d'AscOOH dans des cellules Caco-2</i>	54
3.4.2.	<i>Effet de l'incubation d'AscOOH sur les transporteurs du glucose dans des cellules HepG2</i>	55
3.4.3.	<i>Effet de différents mélanges d'HAIV sur la génération d'AscOOH</i>	56
3.5.	DOSAGES BIOCHIMIQUES UTILISÉS.....	57
3.5.1.	<i>Dosage des peroxydes</i>	57

3.5.2.	<i>Dosage protéique</i>	58
3.5.3.	<i>Dosage de la créatinine</i>	58
3.5.4.	<i>Dosage des lipides plasmatiques et hépatiques</i>	59
3.5.5.	<i>Dosage du lactate et pyruvate hépatiques</i>	59
3.5.6.	<i>Dosage du glucose et glucose-6-phosphate hépatique</i>	60
3.5.7.	<i>Dosage du glycogène</i>	61
3.5.8.	<i>Détermination du statut redox</i>	61
3.6.	ANALYSES STATISTIQUES.....	62
4.	RÉSULTATS	63
4.1.	VALIDATION DE LA MÉTHODE DE DOSAGE QUANTITATIF DE L'ASCORBYLPEROXYDE AU LC-MS.....	63
4.1.1.	<i>Optimisation de la détection au MS</i>	63
4.1.2.	<i>Choix de la phase mobile et optimisation de la chromatographie</i>	64
4.1.3.	<i>Seuils de détection et de quantification</i>	70
4.1.4.	<i>Coefficients de variation (intra- et inter-essai)</i>	70
4.1.5.	<i>Choix de l'étalon interne</i>	70
4.1.5.1.	Détection et stabilité.....	70
4.1.5.2.	Courbes de calibration.....	71
4.1.5.3.	Courbe d'enrichissement.....	73
4.1.6.	<i>Système générateur d'ascorbylperoxyde</i>	73
4.1.7.	<i>Stabilité et caractérisation de l'ascorbylperoxyde</i>	77
4.1.8.	<i>Traitement des échantillons</i>	79
4.2.	PROCOLES EXPÉRIMENTAUX <i>IN VIVO</i>	81
4.2.1.	<i>Quantification de l'ascorbylperoxyde dans l'urine d'enfants nés prématurément sous HAIV ± lumière</i>	81
4.2.2.	<i>Quantification de l'ascorbylperoxyde dans l'urine de cochons d'Inde néonataux sous HAIV ± lumière</i>	82
4.2.3.	<i>Effet de l'infusion d'AscOOH chez le cochon d'Inde néonatal</i>	83
4.3.	PROCOLE EXPÉRIMENTAL <i>IN VITRO</i>	88
4.3.1.	<i>Effet de l'incubation d'AscOOH sur la viabilité cellulaire et la concentration en glutathion dans des cellules Caco-2</i>	88
4.3.2.	<i>Effet sur des cellules HepG2 de l'incubation d'AscOOH sur l'entrée du glucose</i>	90
4.3.3.	<i>Effet de différents mélanges d'HAIV sur la génération d'AscOOH</i>	91
5.	DISCUSSION	93
6.	RÉFÉRENCES	103
	ANNEXE I	115

ANNEXE II.....	116
ANNEXE III	117
ANNEXE IV.....	118
ANNEXE V	119

Liste des figures

Figure 1. Conformation polaire du peroxyde d'hydrogène.....	13
Figure 2. Structure proposée de l'ascorbylperoxyde.	14
Figure 3. Produits de dégradation de la vitamine C, après l'intermédiaire DKG.	16
Figure 4. Équation de la réaction de Fenton.	18
Figure 5. Système de recyclage des antioxydants cellulaires.....	19
Figure 6. Structure des flavines.....	20
Figure 7. Spectre d'absorption et de fluorescence de la riboflavine dans une solution aqueuse neutre.....	21
Figure 8. Schéma des mécanismes d'excitation et de désactivation de la riboflavine.....	22
Figure 9. Photo-oxydation théorique de l'ascorbate en ascorbylperoxyde.....	24
Figure 10. Réactions simplifiées proposées pour expliquer la génération d'AscOOH dans les solutions d'HAIV.....	25
Figure 11. Structure des molécules 136 et 208 suggérées par Deutsch <i>et al.</i>	26
Figure 12. Formation des espèces oxydantes <i>in vivo</i> à partir de la réduction de l'oxygène, et la gestion cellulaire pour régulariser leurs concentrations.....	30
Figure 13. Structure du GSH.....	31
Figure 14. Vitamines antioxydantes liposolubles.....	33
Figure 15. Schéma simplifié du métabolisme énergétique hépatique étudié.....	36
Figure 16. Structure de l'OTC.....	49
Figure 17. Schématisation des solutions expérimentales de l'expérience 3.4.3.....	57
Figure 18. Différents chromatogrammes d'urines résultant de la mise au point de la chromatographie.....	64
Figure 19. Chromatogrammes types avec la méthode chromatographique retenue.....	65
Figure 20. Résultat de l'analyse de l'AscH ⁻ au LC et au MS.....	66
Figure 21. Résultat de l'analyse du DHA au LC et au MS.....	66
Figure 22. Résultat de l'analyse du DKG au LC et au MS.....	67
Figure 23. Résultat de l'analyse du thréonate au LC et au MS.....	67
Figure 24. Enrichissement d'un échantillon d'urine en DKG (5mM) pour confirmer son temps de rétention.....	68

Figure 25. Enrichissement d'un échantillon d'urine avec un système générateur pour l'identification des analytes d'intérêt.	69
Figure 26. Résultat d'une analyse en scan (m/z 50 – 600) d'un système générateur.....	69
Figure 27. Analyse en scan de l'OTC (5mM) au MS en injection directe à 25 et 70V.....	71
Figure 28. Courbe étalon externe de l'OTC.....	71
Figure 29. Courbe étalon interne de l'OTC dans un système générateur.....	72
Figure 30. Courbe étalon interne de l'OTC dans une urine.....	72
Figure 31. Courbe d'enrichissement de l'OTC dans un échantillon d'urine.....	73
Figure 32. Fragmentogramme d'un système générateur photo-exposé analysé en injection directe.....	74
Figure 33. Effet de l'intensité lumineuse sur la formation d'AscOOH.....	74
Figure 34. Formation de l'AscOOH en fonction de trois pH.....	75
Figure 35. Formation d'AscOOH selon le rapport surface/volume du système générateur.....	75
Figure 36. Effet de l'aération du système générateur lors de l'incubation.	76
Figure 37. L'effet de la concentration de la Rf sur la génération d'AscOOH.....	76
Figure 38. Stabilité de l'AscOOH sur 167 jours à -80°C.....	77
Figure 39. Effet de l'ajout de métabisulfite de sodium sur l'AscOOH d'un système générateur, sans ajustement du pH pour l'incubation.	78
Figure 40. Effet du NaBH ₄ sur l'AscOOH.....	79
Figure 41. Formation d'AscOOH urinaire post-excrétion dû à l'AscH ⁻ présent.	80
Figure 42. AscOOH urinaire chez des enfants nouveau-nés sous HAIV ± lumière.....	81
Figure 43. AscOOH urinaire chez des animaux sous HAIV +lumière.....	82
Figure 44. Concentration urinaire d'AscOOH en fonction de la concentration infusée.....	83
Figure 45. Triglycéridémie en fonction de l'AscOOH urinaire.	84
Figure 46. Cholestérol plasmatique en fonction de l'AscOOH urinaire.	84
Figure 47. Pyruvate hépatique en fonction de l'AscOOH urinaire.....	85
Figure 48. Glycémie en fonction de l'AscOOH urinaire.	85
Figure 49. Potentiel redox hépatique en fonction de l'AscOOH urinaire.....	86
Figure 50. Potentiel redox érythrocytaire en fonction de l'AscOOH urinaire.....	86
Figure 51. Potentiel redox sanguin en fonction de l'AscOOH urinaire.	87
Figure 52. Alvéolarisation pulmonaire en fonction de l'AscOOH urinaire.....	88
Figure 53. AscOOH dosé dans les milieux apicaux et basolatéraux, ainsi que dans les lysats cellulaires, en fonction de l'AscOOH mesuré dans les milieux d'incubation	89

Figure 54. Relation entre l'AscOOH cellulaire et le glutathion total du modèle Caco-2.....	90
Figure 55. Relation entre l'AscOOH urinaire et le glutathion total érythrocytaire du modèle animal.....	90
Figure 56. Effet de l'AscOOH sur le transport intracellulaire du glucose.....	91
Figure 57. Effet de l'ajout des multivitamines à une solution d'HAIIV de dextrose, d'acides aminés ou de lipides.....	92
Figure 58. Métabolisme de la méthionine <i>in vivo</i>	115
Figure 59. Peroxydation lipidique.....	116
Figure 60. Premières étapes de l'oxydation de l'acide ascorbique et les principaux produits de dégradation.....	117
Figure 61. Effet du voltage de fragmentation sur le scan au LC-MS d'un système générateur.	118
Figure 62. AscOOH généré par rapport à la concentration initiale d'AscH ⁻ présente dans différents systèmes générateurs préparés en janvier 2007.....	119

Liste des tableaux

Tableau 1. Glutathion total (oxydé et réduit) et le pourcentage de l'oxydé sur le total pour chaque tissu analysé en fonction de la concentration du syst. gén. infusé à l'animal.....87

Liste des abréviations

2-DOG	:	2-déoxyglucose
ACC	:	acétyl-CoA carboxylase
ACN	:	acétonitrile
AMP	:	adénosine monophosphate
AMPK	:	protéine kinase activée par l'AMP
Asc ^{•-}	:	radical ascorbyle anionique
Asc ²⁻	:	ascorbate (dianion)
AscH ⁻	:	ascorbate (monoanion), forme dominante en solution
AscH ₂	:	acide ascorbique
AscOOH	:	ascorbylperoxyde
CHOL	:	cholestérol
DHA	:	déshydroascorbate
DKG	:	acide dicétogulonique
ESI	:	électrospray
FAD	:	flavine adénine dinucléotide
FMN	:	flavine mononucléotide
FOX	:	méthode de l'oxydation du xylénol orange par le fer ferreux
G6P	:	glucose-6-phosphate
G6PDH	:	glucose-6-phosphate déshydrogenase
GCL	:	γ-glutamylcystéine ligase
GLUT	:	perméases du glucose (« GLUcose Transporters »)
GR	:	glutathion réductase
GS	:	glutathion synthétase
GSH	:	glutathion réduit
GSSG	:	glutathion oxydé
GST	:	glutathion-S-transférase
H ₂ O ₂	:	peroxyde d'hydrogène
HAIV	:	hyper-alimentation intraveineuses
HIF-1	:	facteur inductible par l'hypoxie 1 (« <u>H</u> ypoxia- <u>I</u> nducible <u>F</u> actor 1 »)
HNE	:	4-Hydroxy-2-nonéal

IV	:	intraveineux
LC	:	chromatographie liquide; la technique ou l'appareil
LC-MS	:	chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
m/z	:	ratio de masse sur charge
MDA	:	malondialdéhyde
MPA	:	acide métaphosphorique
MS	:	spectrométrie de masse (technique) ou spectromètre de masse (appareil)
MV	:	multivitamines
NADPH	:	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (réduit)
NP	:	nutrition parentérale
OTC	:	acide L-2-oxothiazolidine 4-carboxylique
PDH	:	pyruvate déshydrogenase
PP2A	:	protéine phosphatase 2A
Rf	:	riboflavine
ROS	:	espèces réactives de l'oxygène (« <u>R</u> eactive <u>O</u> xygen <u>S</u> pecies »)
RP-HPLC	:	chromatographie liquide en phase inverse
SAM	:	S-adenosyl-L-méthionine
SIM	:	au MS, détection de m/z précises (« <u>S</u> electe <u>d</u> <u>I</u> ons <u>M</u> onitoring »)
SOD	:	superoxyde dismutase
SVCT	:	transporteur sodium-dépendant de la vitamine C
TG	:	triacylglycérol
TGH	:	triacylglycérol hydrolase hépatique
THDH	:	4,5,5,6-tétrahydroxy-2,3-dicétohexanoïque
TIC	:	somme des pics des m/z détectées au LC-MS (« <u>T</u> otal <u>I</u> on <u>C</u> urrent »)
TPP	:	triphénylphosphine
Trx	:	thiorédoxine
VLDL	:	lipoprotéine de très basse densité

Remerciements

Mes remerciements vont d'abord à mon directeur, le Dr Jean-Claude Lavoie, ce passionné de science toujours enthousiaste malgré les aléas de la recherche. Ses enseignements, ses judicieux conseils et sa disponibilité furent appréciés. Un grand merci à Thérèse pour le partage de ses connaissances et de son expérience. Merci à Valérie avec qui j'ai partagé mon quotidien au laboratoire. Un merci spécial à Khalil pour avoir pris le temps de m'expliquer les subtilités de la LC-MS. Enfin, je ne peux passer sous silence l'aide obtenue chez nos voisins de laboratoire, l'équipe du Dr Lévy. Je remercie particulièrement Carole, François, Louis-Philippe, Geneviève M. et Émilie. Merci aux deux fondations (Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine et Fondation de la recherche sur les maladies infantiles) à la source de ma bourse. Merci à Pauline, Chantale, Dominika, et toutes celles qu'on oublie trop souvent. Merci bien sûr aux membres du jury de prendre le temps de me lire et de se prononcer sur la qualité de mon ouvrage. Un merci infini à ma famille pour ses valeurs, son unité, son unicité et son support. Je remercie finalement du fond du cœur celle qui parfait ma vie : tu m'encourages quand je suis découragé, tu me supportes quand je suis insupportable, tu crois en moi quand je perds confiance, bref tu es là avec moi.

1. Introduction

L'hyper-alimentation intraveineuses (HAIV), ou nutrition parentérale (NP), se définit comme l'infusion dans la circulation sanguine des nutriments essentiels au développement normal de l'organisme [1, 2]. Cette forme de nutrition est temporairement privilégiée lorsque l'alimentation entérale est physiologiquement impossible ou préjudiciable pour la santé [3, 4]. Encore inapte à recevoir l'alimentation entérale, les enfants nés prématurément sont souvent dépendants de l'HAIV pour assurer leur survie [1]. Expérimentée pour les premières fois dans les années 1960 et améliorée depuis [1, 5], cette forme d'assistance alimentaire vitale aux prématurés a pourtant encore aujourd'hui son lot d'inconvénients, comme il en sera question plus loin.

Depuis une dizaine d'années, le laboratoire d'accueil s'intéresse à la photochimie des composantes de l'HAIV, et de façon particulière aux effets de l'exposition à la lumière ambiante des solutions d'HAIV sur le métabolisme énergétique, notamment. Par exemple, Knafo et coll. ont rapporté en 2005 une association entre l'abondance urinaire d'un dérivé peroxydé de la vitamine C présent dans l'HAIV photo-exposée et une augmentation de l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase, une enzyme clé de la lipogenèse [4]. Le métabolite peroxydé en question, jamais caractérisé auparavant, est issu de la photo-oxydation de la vitamine C et a donc été nommé ascorbylperoxyde (AscOOH). Mon projet de 2^e cycle, décrit dans cet ouvrage, s'inscrit dans la continuation du projet exposé dans le papier de Knafo *et al.*, et consiste principalement au perfectionnement de la méthode de dosage de l'AscOOH et à l'investigation d'une activité biologique suspectée par des études antérieures.

Pour bien comprendre la problématique de mon sujet de maîtrise, l'introduction de ce mémoire définira d'abord l'HAIV, avec ses avantages, inconvénients et limites dans notre population d'intérêt : les enfants nés prématurément. Puis, le contenu de l'HAIV en molécules oxydantes sera détaillé, ainsi que le lien entre ces molécules et des processus physiologiques. C'est ici aussi que sera introduit l'AscOOH et le mécanisme de sa formation par interaction entre la vitamine C et la riboflavine. Ces deux vitamines ont un rôle central et leurs caractéristiques seront donc explicitement exposées. Suite à la présentation des molécules oxydantes, on verra la régulation physiologique de l'état redox et la particularité des défenses antioxydantes chez les prématurés. L'introduction s'achèvera de façon

pratique par un survol du métabolisme hépatique étudié, ainsi que par une description de la technique de spectrométrie de masse utilisée pour quantifier l'AscOOH.

1.1. Le paradoxe de la nutrition parentérale

Le paradoxe de l'HAIV s'énonce ainsi : alors qu'elle permet l'apport immédiat des nutriments vitaux aux prématurés, son infusion prolongée est associée à des complications, notamment hépatiques, qui peuvent devenir sévères [5]. De plus, il est bien documenté que cette soupe de nutriments est propice à des interactions chimiques préjudiciables [6, 7].

1.1.1. Un traitement indispensable aux prématurés et aux bébés de faible poids à la naissance

Il est rapporté qu'en 2000, presque 12% de toutes les naissances aux États-Unis survenaient avant 37 semaines de gestation et que 1,4% des tous les nouveau-nés pesaient moins de 1 500g à la naissance [8]. Heureusement, les soins néonataux se sont beaucoup améliorés : le taux de survie chez les moins de 1 500g est passé de moins de 50% dans les années 1970 à plus de 90% aujourd'hui [8]. L'HAIV est utilisée depuis la fin des années 1960 pour sauver la vie des bébés nés prématurément [1, 3]. En effet, ces nourrissons naissent avec un développement incomplet et de très faibles réserves énergétiques, alors que la demande en énergie est évidemment énorme [1, 2, 9]. De plus, l'accrétion intra-utérine de plusieurs nutriments se fait au dernier trimestre de grossesse et n'est donc pas complet chez les prématurés [9]. L'intolérance à la nutrition entérale, l'immaturité du tube digestif, la maladie, l'incapacité de sucer ou d'avaler, ou les risques d'entérocolite nécrotique empêchent leur alimentation normale par la bouche et rendent l'enfant très vulnérable [9, 10]. Sans traitement, ces enfants se retrouvent dans un état de famine qui peut les mener à la mort en cinq jours [1, 2]. C'est souvent ce qui arrivait avant le développement de l'HAIV [11]. L'HAIV fournit théoriquement aux jeunes patients, pendant les deux à trois premières semaines de vie, habituellement, une alimentation complète et équilibrée qui favorise leur croissance et la poursuite de leur développement [1, 3, 12].

L'infusât contient normalement les éléments suivants : du glucose, des lipides, des acides aminés, des électrolytes, des métaux et minéraux, ainsi que des vitamines [1, 2]. La formulation exacte varie en fonction de l'âge gestationnel, de l'âge postnatal, de la maturité,

ainsi que des conditions cliniques [2, 9]. Elle dépend également de la veine utilisée pour l'infusion – centrale ou périphérique – puisque leur tolérance osmolaire varie [1, 2, 9]. La composition de l'HAIV dépend surtout du but à atteindre : maintenance du poids, croissance, ou rattrapage de croissance [2]. Pourtant, il est important de comprendre que la formulation est le fruit de plusieurs décennies de pratiques cliniques empiriques [13] et d'estimations des besoins [9]. Il est donc évident que la composition de l'HAIV n'est pas une copie exacte du ratio de glucose, d'acides gras et de protéines retrouvé *in utero* [9].

1.1.2. Problèmes liés au contenu des solutions d'HAIV

1.1.2.1. Nutriments et posologie

D'abord, malgré beaucoup de recherches scientifiques depuis les années 1950 sur la nutrition pédiatrique, c'est un domaine qui reste flou, incertain et qui avance lentement, surtout dans le cas des prématurés [14, 15]. Le but de l'HAIV est d'imiter la composition du flux placentaire en nutriments. Traditionnellement, les recherches ont surtout été empiriques et basées sur la suppression des déficiences, alors que la vision actuelle de la nutrition inclut de plus en plus les interactions entre nutriments et santé, et l'influence de la nutrition sur la vie adulte [14].

Le nouveau-né prématuré a d'abord un besoin immédiat en dextrose. Ce dernier est, avec les lipides, la source d'énergie prédominante en préservant les acides aminés pour l'anabolisme [1, 13]. L'apport est ajusté pour obtenir une glycémie entre 2,5 et 8,3mM [1, 9]. Les prématurés sont sensibles à l'hyperglycémie, et un excès de glucose sanguin mène à une intolérance qui peut entraîner la rétinopathie, des hémorragies intra ventriculaires, de la diurèse osmotique, et des dysfonctions hépatiques et pulmonaires [9, 13]. L'intolérance au glucose peut être atténuée par une infusion raisonnable d'insuline en permettant aussi d'augmenter l'utilisation du dextrose [2, 9]. Le glucose non oxydé peut être utilisé pour la voie de la lipogénèse. Ceci n'est pas une mauvaise chose pour ces patients, mais si l'export des VLDL au foie est saturé il y a risque de stéatose [13].

Les bébés sous HAIV reçoivent aussi environ 3g/kg/d d'acides aminés – et davantage si la condition clinique le prédispose [2, 9]. Le but étant de simuler l'état *in utero* en procurant un substrat qui permet la déposition des protéines et le gain de masse maigre, en limitant le catabolisme [1, 9]. Ici encore, il faut agir avec parcimonie car un excès d'acides aminés élève le niveau sanguin d'urée, l'ammoniurie et les niveaux de certains

acides aminés potentiellement toxiques telle la phénylalanine [1]. La composition doit donc être ajustée aux conditions physiologiques particulières du prématuré. La cystéine est spécialement problématique. En effet, le pool de cystéine est particulièrement bas chez les prématurés, et ceci serait dû à l'activité très basse, voire nulle, de la cystathionase [2, 9]. Cette enzyme participe à la synthèse de cystéine à partir de la méthionine (Figure 58 page 115). La cystéine est notamment décrite comme bénéfique pour la rétention de l'azote protéique et nécessaire pour la synthèse endogène de taurine et de glutathion qui sont essentiels à plusieurs phénomènes physiologiques dont la défense antioxydante, mais l'ajout de cystéine est techniquement difficile à cause de son instabilité [2, 9]. On a donc trouvé des alternatives comme le chlorhydrate de cystéine qui est hydrosoluble et relativement stable à court terme. Cependant, sa supplémentation n'est pas universelle [2]. Néanmoins, une équipe a récemment montré que la cystathionase néonatale était fonctionnelle et que les résultats décevants des études cliniques sur la supplémentation en cystéine était peut-être dus à un niveau très élevé de transsulfuration chez le nouveau-né [16].

« L'apport lipidique est essentiel chez l'enfant prématuré, tant sur le plan quantitatif (apport énergétique) que sur le plan qualitatif (apport en acides gras essentiels). » [12] Sans cet apport en acides gras essentiels – linoléique (ω -6), et linoléinique (ω -3) –, il y a carence en 3 à 7 jours chez les prématurés [9, 13]. L'HAIV fournit habituellement un minimum de 0,5g/kg/d de lipides [9]. Plusieurs formules de sources différentes existent, avec des compositions en acides gras très variables. La qualité des lipides est un sujet de controverse important du point de vue des carences en certains acides gras essentiels et des liens avec des maladies associées à la nutrition parentérale chez le nouveau-né. En effet, la croissance du fœtus exige des acides gras précis afin de synthétiser les membranes des différents types cellulaires. Or, l'accrétion de gras chez ces nouveau-nés s'effectue majoritairement et de façon exponentielle durant le troisième trimestre, et c'est spécialement le cas de l'acide gras docosahexaénoïque [1, 9, 17]. Également, l'absence d'acides gras essentiels à longue chaîne, i.e. à plus de 18 carbones tel l'acide arachidonique, dans l'HAIV peut poser problème, car la capacité d'allonger et de désaturer les acides gras linoléinique et linoléique en longues chaînes est limitée chez l'enfant prématuré [2]. En clinique, la première formule commerciale développée, et probablement la plus largement utilisée aujourd'hui, Intralipid®, est composée d'huile de fèves de soya émulsifiée avec des phospholipides de jaunes d'œuf [18]. Intralipid® contient 52% d'acide linoléique (ω -6),

8% d'acide linoléique (ω -3), 22% d'acide oléique, et peu de gras saturés [18, 19]. Ainsi, la composition de l'huile végétale diffère beaucoup de celle du lait maternel [9]. Les lipides ω -6 sont connus pour être relativement pro-inflammatoires [11]. Des formules à base d'huile d'olive, de carthame ou de poissons ont donc été développées, mais ne sont jamais utilisées en monothérapie [11, 12]. Les huiles de poissons contiennent notamment les acides gras arachidonique et eicosapentaénoïque, bénéfiques pour la santé en contrant les carences en acides gras essentiels [11]. À l'opposé, les bébés prématurés peuvent aussi souffrir d'intolérance aux lipides, qui se caractérise par l'augmentation de la bilirubine libre, une diminution des fonctions pulmonaires menant à la détresse respiratoire, ou des interférences avec les fonctions plaquettaires et immunitaires [1, 2]. De plus, étant donné l'activité réduite de la lipoprotéine lipase en fonction de la prématurité et le peu de masse musculaire et grasseuse, il ne faut pas exagérer la dose pour éviter l'hypertriglycéridémie qui résulte en une captation augmentée par le foie [2, 9].

Finalement, des métaux en très faible quantité, minéraux, électrolytes et vitamines sont ajoutés à l'HAIV, afin d'éviter certaines carences sinon fréquentes [1]. Les informations et les études manquent concernant les doses réelles requises [2]. On connaît surtout les doses minimales et maximales [20]. Par exemple, le zinc a un grand éventail de fonctions physiologiques et est donc à risque de déficience, d'autant plus que sa concentration sérique est fonction du poids de naissance [9, 13]. Aussi, les prématurés naissent avec de faibles réserves hépatiques de sélénium nécessaires à certaines enzymes antioxydantes clés comme la glutathion peroxydase [21]. Les bébés prématurés ont aussi raté la majeure partie de l'accrétion intra-utérine de calcium et de phosphore, où 80% des os sont formés [9]. À l'opposé, le manganèse risque d'être en excès à un niveau toxique car il n'est pas excrété dans la bile [13]. Quant aux vitamines, il est connu que les prématurés ont des concentrations sériques moindres en vitamines antioxydantes (A, E et C) comparé aux enfants nés à terme, c'est pourquoi on en retrouve dans l'HAIV [22]. En fait, des préparations multi-vitaminiques commerciales sont souvent ajoutées à l'HAIV, mais elles sont plus ou moins adaptée à la condition particulière de la prématurité étant donné que les besoins des prématurés sont mal caractérisés et varient selon les individus [13]. Néanmoins, ces préparations contiennent vitamines A, B₁₂, C, D, E, K, thiamine, riboflavine, niacine, pyridoxine, acide folique, acide pantothénique et biotine [13]. Les données d'essais randomisés manquent quant aux doses précises requises en vitamines [2], mais ce sont tout de même les nouveau-nés qui reçoivent le plus de vitamines dans leur HAIV [6].

Enfin, l'essentiel à retenir de ces considérations clinique est que l'HAIV est un mélange complexe dont l'optimum infusé est déterminé par un monitoring constant des paramètres nutritionnels des jeunes patients. Le clinicien se trouve toujours à balancer entre l'excès et la carence.

1.1.2.2. Considérations chimiques

Nous avons survolé les considérations cliniques pour comprendre que l'HAIV est complexe, mais ce qui nous intéresse vraiment, ici, est définitivement ses considérations chimiques.

Traditionnellement, l'ensemble des composantes de l'HAIV est administré en une seule solution, sauf les lipides qui sont en dérivaison (soluté binaire) [12, 23]. Tous les composants de l'HAIV peuvent aussi être mélangés en un seul soluté ternaire (glucose, acides aminés, lipides), dit « tout-en-un » [12]. De plus en plus, les adultes reçoivent ce tout-en-un, alors que les nouveau-nés et enfants reçoivent encore l'HAIV avec les lipides séparées [23, 24]. Indépendamment du type de soluté, binaire ou ternaire, on comprend que la stabilité physicochimique, la compatibilité et les interactions entre composantes du mélange d'HAIV est une contrainte importante dans la recherche constante d'optimiser l'HAIV. On s'imagine facilement qu'en mélangeant des constituants, on crée des problèmes de compatibilité et on augmente la probabilité de formation de sous-produits [20].

En fait, les principaux problèmes de compatibilité et stabilité dans l'HAIV sont la formation de gros globules lipidiques, la précipitation de sels insolubles, la peroxydation lipidique et la dégradation de vitamines et acides aminés [24].

L'ajout d'électrolytes, d'éléments trace et de vitamines complexifie l'équilibre des solutions d'HAIV [20]. Par exemple, les ions monovalents ne présentent pas de problèmes de compatibilité, alors que les ions di- et trivalents peuvent précipiter [20]. Le pH a une influence majeure et il est lui-même influencé par les constantes de dissociation des composantes [20, 24]. Allwood *et al.* [20] rapportent que les vitamines sont considérées comme les éléments les moins stables des solutions d'HAIV. Parmi celles-ci, c'est la vitamine C qui est la plus instable. Elle est dégradée par interaction directe avec l'oxygène dissout provenant des manipulations, de l'air résiduel et de la diffusion d'air à travers le sac. La dégradation est accélérée par la présence d'éléments traces. Paradoxalement, la présence de vitamine C améliore globalement la stabilité de l'HAIV en favorisant un environnement chimique réduit. En outre, la vitamine A et la riboflavine (B₂) sont sensibles

à la photolyse. La vitamine A, sous sa forme estérifiée, interagit également avec les plastiques utilisés pour contenir l'HAIV [9]. On observe aussi de la dégradation chimique, telle que la réduction de la thiamine par le métabisulfite de sodium et l'oxydation de la vitamine C. Toutefois, le métabisulfite n'est plus ajouté de nos jours à cause de ses propriétés allergènes. Le tocophérol (vitamine E) est relativement stable sous forme acétate dans l'HAIV, mais plusieurs pensent, à tort, que cette forme stabilisée permet de réduire la formation de peroxydes en stoppant la cascade radicalaire de peroxydation lipidique [24]. Globalement, les vitamines devraient être ajoutées peu de temps avant l'infusion [20], mais en clinique c'est rarement ce qui se fait.

Pour éviter la dégradation des vitamines, les Européens ajoutent souvent les vitamines à la fraction lipidique, contrairement à ce qui se fait en Amérique du Nord [23]. Certains affirment que cela permet à la fois d'éviter la peroxydation de l'émulsion lipidique et en partie la photo-dégradation des vitamines [25, 26]. Cependant, les données de notre laboratoire suggèrent le contraire [6].

Les interactions entre les composantes, la lumière et l'oxygène provoquent la génération de peroxydes organiques et inorganiques. Par exemple, les acides gras insaturés sont sujets à la peroxydation [19]. Les solutions de lipides fraîches sont déjà contaminées par des niveaux de peroxydes 10 000 fois supérieurs aux concentrations mesurées en condition physiologique plasmatique [6, 19], et leur exposition à la lumière favorise la continuation de la peroxydation [25, 26]. Également, le laboratoire d'accueil a montré en 1997 que les multivitamines exposées à la lumière étaient d'importants générateurs de peroxydes – surtout du peroxyde d'hydrogène – en quantité micromolaire [6, 27]. Des expériences ont permis d'incriminer plus spécifiquement l'ascorbate et la riboflavine [27]. L'ajout des multivitamines à l'émulsion lipidique augmentait la génération de peroxydes, alors qu'avec les acides aminés il y avait une diminution [6]. Les facteurs temps et lumière favorisaient la génération de peroxydes [6]. Des peroxydes sont même retrouvés dans l'urine des bébés sous HAIV [28]. En fait, le contenu oxydant de l'HAIV sera détaillé à la section 1.2 en page 12.

Les interactions complexes dans les solutions d'HAIV engendrent donc la formation de molécules potentiellement bioactives. On peut supposer que ces peroxydes organiques et inorganiques ont des rôles physiologiques délétères, et favorisent le développement de complications associées à l'HAIV.

1.1.3. Les complications associées à l'HAIV néonatale

Malgré tous les bienfaits que l'HAIV apporte et l'expérience acquise au cours des dernières décennies, il subsiste beaucoup d'inconnus et la technique demeure très complexe [1, 10, 24]. Par-dessus tout, ce traitement est associé à plusieurs complications, dont les plus communément rapportées sont de nature hépatobiliaire, et peuvent entraîner une insuffisance hépatique [1, 3]. La sepsie, une infection du sang résultant de la migration microbienne le long du cathéter veineux, est aussi une des complications possible, même si elle est devenue assez rare avec les décennies de pratique et les progrès en stérilisation [1-3]. Les patients sous HAIV peuvent également développer une atrophie intestinale, des thromboses, une intoxication due à des contaminants, ainsi qu'une augmentation de la susceptibilité aux stimuli inflammatoires [10, 13]. Toutes ces complications sont associées à la morbidité et la mortalité. L'HAIV nécessite donc un monitoring constant. Elle devrait durer le moins longtemps possible et favoriser une prise de l'alimentation entérale le plus rapidement possible [1, 9].

La cholestase est un défaut de sécrétion de la bile [29]. La cholestase associée à l'infusion d'HAIV chez le nouveau-né a été rapportée dans la littérature depuis les débuts de la technique. La prévalence varie de 8 à 80% des nouveau-nés sous HAIV, selon les études, mais le pourcentage semble avoir décliné dans le temps suivant une étude de Kubota *et al.* [3, 30]. La cholestase s'accompagne toujours d'une élévation de la concentration sérique en bilirubine et en enzymes hépatiques [1, 3, 9]. L'étiologie est mal comprise, mais on croit qu'elle est multifactorielle [3, 9, 30]. Une chose est sûre, cette complication est fonction du temps : elle est inévitable avec 180 jours d'infusion [3]. Les facteurs de risque sont l'immaturité, le poids, l'âge gestationnel bas, les infections et l'absence d'alimentation entérale [9, 31, 32]. Plusieurs mécanismes sont suspectés contribuer à cette complication hépatique importante liée à l'HAIV : la sepsie, une déficience en certains nutriments (taurine, choline, carnitine, manganèse), un excès calorique ou glucidique, le jeûne entéral, le déséquilibre des hormones du système digestif, la stase biliaire, une hypoxie chronique, une hyperammoniémie, des carences diverses, la déshydratation hyperosmolaire, une altération du métabolisme de l'insuline, l'excès ou l'accumulation d'acides aminés (excès de méthionine versus carence en cystéine), un stress oxydant, etc. [1, 3, 31] Comme le pool de cystéine est bas chez le prématuré, une déficience en taurine ou en glutathion résultant de la cystéine a aussi été

suspecté comme faisant partie de la cause. Rappelons que la taurine et le glutathion participent à la sécrétion de la bile [33, 34]. Chez l'humain, l'association entre certaines émulsions lipidiques et des dysfonctions hépatiques a aussi été établie [11]. Les phytostérols provenant de l'huile de soya sembleraient avoir des effets délétères sur la sécrétion biliaire, alors que l'huile de poisson riche en acides eicosapentaénoïque et docosahexaénoïque renverserait la cholestase [11]. Dans notre modèle animal, Lavoie et coll. ont montré en 2005 que la cholestase est indépendante de la photo-exposition de l'HAIV à la lumière et du stress oxydant, mais dépendant d'une infusion de glucose-NaCl, avec un effet additif de l'ajout d'acides aminés [35].

Normalement, cette complication hépatique devrait se rectifier suite à l'arrêt du traitement et une prise de l'alimentation entérale [3, 11]. Une biopsie peut toutefois souvent révéler des anomalies subtiles qui perdurent, comme de la fibrose, suggérant des dommages structuraux irréversibles [31]. Dans certains cas, la cholestase peut pourtant progresser jusqu'à la cirrhose, l'insuffisance hépatique et même la mort [3].

En outre, le spectre des histopathologies hépatiques ne s'arrête pas à la cholestase. Une étude post-mortem sur 24 nouveau-nés prématurés ayant reçu une HAIV a montré une prévalence de stéatoses modérées de 30% [36]. La stéatose hépatique est la rétention lipidique sous forme micro- ou macro-vésiculaire dans les hépatocytes [37]. En 2002, Chessex *et al.* ont montré que chez le cochon d'Inde, la photo-exposition des multivitamines de l'HAIV est associée à la stéatose hépatique [37]. Le mécanisme hépatotoxique passerait par un stress oxydant, puisque la stéatose était dépendante de la présence de riboflavine et d'acide ascorbique dans l'HAIV exposée à la lumière. Ces vitamines ensemble généraient des peroxydes inorganiques et organiques, mais la stéatose était indépendante du contenu en H₂O₂. Toutefois, il est connu que la stéatose associée à l'HAIV est plus commune chez l'adulte que chez le nouveau-né [38]. Ceci s'explique peut-être parce que la stéatose n'est pas vérifiée de façon systématique chez les nouveau-nés et que ces patients ne sont pas en mesure d'exprimer leur inconfort au niveau hépatique.

Fait intéressant, dans une étude de Beale *et al.* sur la cholestase, tous les enfants avec cette complication présentaient également des problèmes pulmonaires [31]. Les maladies respiratoires aiguës et chroniques sont les plus fréquentes dans les unités de soins néonataux [39, 40]. La dysplasie broncho-pulmonaire est une complication majeure de la prématurité et se caractérise par une interruption du développement alvéolaire et

vasculaire dans le poumon [41, 42]. Initialement, on a pensé que les hautes doses d'oxygène souvent administrées aux bébés étaient responsables de la complication, mais on comprend maintenant que c'est davantage un stress oxydant global qui contribue au développement de la dysplasie broncho-pulmonaire [40]. Des données récentes du laboratoire vont dans ce sens : les peroxydes contaminants l'HAIV photo-exposée induisent un remodelage et un début de fibrose pulmonaire chez le cochon d'Inde néonatal [23, 42, 43]. Plus précisément, c'est encore une fois l'interaction entre la riboflavine photo-exposée et l'acide ascorbique qui est spécifiquement associé à ces complications pulmonaires [43]. De plus, une analyse post-hoc chez l'enfant prématuré en clinique a montré une tendance entre photo-protection de l'HAIV et diminution de la prévalence de dysplasie broncho-pulmonaire [44].

1.1.4. Programmation fœtale et néonatale

1.1.4.1. Définition et exemple

Outre les complications immédiates, la composition de l'HAIV est préoccupante dans un contexte d'altérations métaboliques à long terme. De fait, la théorie de la programmation, ce concept néo-Lamarckien qui s'étoffe de jour en jour, veut que des perturbations en périodes critiques du développement (i.e. intra-utérin et post-natal) contribuent à la santé à l'âge adulte et à celle des générations suivantes [15]. On l'appelle aussi l'hypothèse de l'origine fœtale, ou développementale, des maladies [15].

Plusieurs données animales et des études épidémiologiques chez l'humain sont à la source de la théorie [45]. Par exemple, divers modèles animaux ont été utilisés et sous/surnourris en période fœtale ou néonatale et des adaptations développementales qui modifiaient la structure, la physiologie et le métabolisme, ont perduré jusqu'à l'âge adulte et à travers les générations suivantes [15, 45]. La manipulation de la nutrition pré- et postnatale est associée à la programmation de la taille adulte, du métabolisme, de la lipidémie, du diabète, de la pression sanguine, de l'obésité, de l'athérosclérose, de l'apprentissage, du comportement et de l'espérance de vie.

Chez l'humain, les données disponibles indiquent qu'il en est de même : plusieurs études épidémiologiques ont notamment associé l'âge gestationnel, la taille et le poids à la naissance avec des risques de maladies cardiovasculaires, d'hypertension, de dyslipidémie, d'obésité, de résistance à l'insuline et de diabète de type 2 à l'âge adulte [8, 14, 45, 46]. Ces

conditions sont toutes des composantes majeures de ce qu'on appelle le syndrome métabolique [47]. C'est surtout la nutrition, les hormones et l'exposition à l'oxygène qui sont les déterminants de la croissance foetale et post-natale [45], et ces conditions jouent sur la plasticité développementale [48]. Considérant cela, et que l'HAIV est une alimentation synthétique qui diffère passablement de la nutrition placentaire, qui est imparfaite et source de problèmes chimiques et biologiques, il est raisonnable de penser que l'HAIV risque d'avoir des effets permanents sur la vie adulte des enfants nés prématurément qui reçoivent ce traitement [49].

1.1.4.2. Mécanismes proposés de la programmation

En fait, on croit que les mécanismes expliquant la programmation sont les modifications épigénétiques, c'est-à-dire des modifications covalentes de l'ADN et du cœur d'histones [15, 47]. Ces modifications ne changent pas la séquence d'ADN, mais modifient la structure tridimensionnelle de la chromatine pour créer de l'hétérochromatine où les facteurs de transcription ont difficilement accès [15, 50]. Ces modifications sont héréditaires, et consistent en la méthylation enzymatique de l'ADN au niveau des dinucléotides CpG et en la modification des queues d'histone (par acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination) sur des sites spécifiques [15, 50]. Ces combinaisons de modifications sur les histones pourraient même constituer un code que certains ont appelé le code épigénétique des histones [15]. Rappelons que les histones sont ces protéines basiques sur lesquelles s'enroule l'ADN. La méthylation, elle, fait référence à l'ajout d'un groupement méthyle (CH_3) à un substrat. La méthylation de l'ADN est vitale : sa suppression chez l'animal est létale [51]. Ce processus est réalisé par des méthyltransférases site-spécifiques en utilisant des groupements méthyles cédés par un donneur principal : le S-adénosyl-L-méthionine (SAM) [51]. On sait depuis peu que les niveaux de reméthylation, de transméthylation et de transsulfuration – ces voies du métabolisme de la méthionine (Voir Figure 58 en annexe, p.115) – sont particulièrement élevés chez les bébés prématurés [16]. De plus, alors que le pool de cystéine est très bas chez les nouveau-nés sous HAIV, cette même nutrition fournit de la méthionine, mais peu ou pas de cystéine. Étant donné que le métabolisme des acides aminés sulfurés est altéré par la prématurité et par la nutrition parentérale [16], il est probable qu'il en résulte une anomalie de la méthylation et de l'épigénétique.

1.2. Charge oxydante de la nutrition parentérale

Comme ce fut abordé précédemment, la complexité des solutions d'HAIV est source d'interactions chimiques favorisant la génération de plusieurs produits oxydants dont les caractéristiques et la formation seront détaillés ici.

1.2.1. Le peroxyde d'hydrogène

Il est rapporté depuis longtemps que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) contamine les solutions d'HAIV [6, 25, 52-54].

Le H_2O_2 est une molécule non radicalaire appartenant au groupe des espèces réactives oxygénées (ROS pour « Reactive Oxygen Species ») [55]. Ce terme collectif englobe des dérivés de l'oxygène, radicaux ou non, mais très réactifs tels l'oxygène singulet et le radical hydroxyle [56]. H_2O_2 est un liquide bleu pâle, complètement miscible dans l'eau [57]. Du point de vue thermodynamique, on aurait pensé que la molécule serait linéaire avec les atomes d'hydrogène aux extrémités [55]. Or, ce n'est pas le cas, car la molécule possède un dipôle permanent, plus important même que celui de l'eau [55]. Rappelons qu'un dipôle est le fruit de l'asymétrie de liens polaires dans la molécule [58]. Aussi, il n'y a pas de rotation libre entre les deux oxygènes à cause des paires d'électrons, ce qui fait du H_2O_2 une molécule chirale (Figure 1) [55]. Ces caractéristiques structurales influencent ses comportements physiologiques, dont son transport intracellulaire [55]. En fait, H_2O_2 est légèrement plus gros que l'eau, et comme l'eau, la diffusion à travers la membrane lipidique se fait via les aquaporines, ou canaux à eau [55, 59]. Le H_2O_2 possède deux constantes de dissociation acide qui sont de 11 et 16, ce qui en fait une molécule non chargée et protonée à pH physiologique [55, 59]. Le nombre d'oxydation des oxygènes de « -1 » est intermédiaire [55]. Ceci est responsable du caractère à la fois réducteur et oxydant du H_2O_2 [55]. Le H_2O_2 n'est pas très réactif au pH physiologique, il n'oxyde pas les biomolécules – lipides, ADN et la plupart des protéines – si facilement [57, 59]. En fait, il y a réaction spontanée seulement avec quelques molécules, au niveau de certains résidus cystéine ayant une constante de dissociation particulière, aux sites actifs de protéines notamment [59]. Sa demi-vie de 1ms est longue par rapport à celle de l'anion superoxyde, par exemple, qui est de 1 μ s [55]. H_2O_2 est à la fois un produit d'oxydation et un substrat pour devenir une espèce encore plus réactive comme un radical oxygéné [6]. Ceci se

produit soit par une exposition à la lumière UV ou par interaction avec un métal de transition tel le fer par réaction de Fenton (Figure 4, page 18) [6, 57].

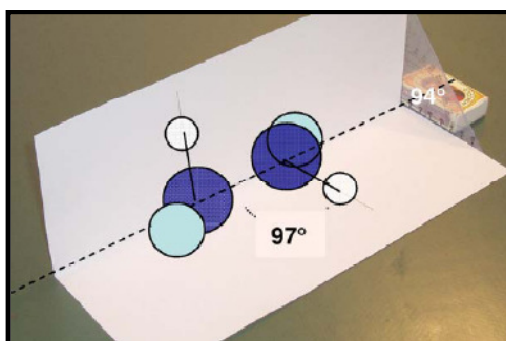


FIGURE 1. Conformation polaire du peroxyde d'hydrogène. L'oxygène est en bleu foncé, les hydrogènes en blanc et les paires d'électrons en bleu pâle. Figure tirée de [55].

Traditionnellement, le peroxyde d'hydrogène étant l'un des ROS les plus abondants, a été associé à des dommages à des biomolécules *in vivo* et à une cytotoxicité à des concentrations $\geq 50\mu\text{M}$ [55, 57]. Or, de plus en plus on lui découvre des rôles physiologiques comme molécule impliquée dans la signalisation, à des concentrations plus faibles [55, 60]. Ceci sera discuté plus loin.

1.2.2. Peroxydation lipidique et produits générés

Il a été montré dans les années 1990 que les émulsions lipidiques utilisées dans l'HAIV néonatale étaient sujettes à la peroxydation [19, 52]. Par exemple, Intralipid® est très susceptible à l'oxydation durant son usage clinique, et de façon particulière lorsque l'émulsion est exposée à la lumière forte utilisée en photothérapie [52]. Même les émulsions fraîchement employées sont contaminées par des lipoperoxydes et des produits de peroxydation lipidique tels les pentanes [25, 61].

La Figure 59 en annexe, p.116, résume explicitement la cascade de la peroxydation lipidique. Brièvement, la peroxydation lipidique est initiée par un radical ou toute espèce chimique assez réactive pour soustraire un atome d'hydrogène d'un carbone méthylène sur la chaîne carbonée d'un acide gras insaturé [56]. Plus la chaîne carbonée contient de double liaisons, plus il est facile de soutirer un atome d'hydrogène, alors que les acides gras monoinsaturés et saturés sont plus résistants à l'attaque radicalaire [56]. Le radical lipidique formé subit un réarrangement moléculaire suivi d'une réaction avec l'oxygène moléculaire générant un radical peroxyde. Ce dernier est très réactif et peut soit soutirer un atome d'hydrogène à d'autres acides gras et ainsi recommencer le cycle, soit attaquer des

protéines. Le radical peroxyde devient ainsi lipoperoxyde [56, 60, 62]. Dans les systèmes biologiques, l'antioxydant qui stoppe cette réaction en chaîne est la vitamine E [56]. La peroxydation lipidique est donc un processus à la fois dépendant de radicaux libres et source de radicaux secondaires [60, 61].

Outre les lipoperoxydes, la propagation de ces réactions de peroxydation entraîne la formation de produits importants tels que les alcanes, le 4-hydroxy-2-nonéal (HNE), le malonedialdéhyde (MDA) ou les isoprostanes, selon l'acide gras de départ [24, 52, 63]. Plusieurs de ces produits sont retrouvés dans les lipides de l'HAIV. Par exemple, des dizaines de micromolaires de lipoperoxydes ont été mesurés dans des bouteilles d'émulsion d'Intralipid® fraîchement ouvertes et des centaines de micromolaires vingt heures plus tard, à la lumière ambiante [19, 52]. Dans le même sens, il a été montré que l'infusion d'HAIV photo-exposée contenant des lipides, par rapport à celle protégée de la lumière, élevait substantiellement le MDA sérique chez des nouveau-nés [64, 65]. Précédemment, Pitkanen *et al.* avaient observé une hausse de dix fois des niveaux de pentanes expirés à la suite de l'infusion d'Intralipid® à des bébés prématurés [61]. La quantité de vitamine E des solutions d'Intralipid® sont donc insuffisante pour éviter la peroxydation [61].

1.2.3. L'ascorbylperoxyde

L'ascorbylperoxyde (AscOOH) (Figure 2) est le nom qui a été donné pour désigner un dérivé peroxydé de la vitamine C de masse moléculaire 208g/mol généré dans les solutions d'HAIV exposées à la lumière ambiante [4]. Son nom chimique est l'acide 2,3-dicéto-4-hydroperoxyl-5,6-dihydroxyhexanoïque. Selon le modèle proposé par le laboratoire, elle est le fruit d'une réaction photochimique complexe impliquant la vitamine C, la vitamine B₂ (ou riboflavine), ainsi que l'oxygène dissous, et qui génère également du H₂O₂. Pour bien comprendre la photochimie de l'AscOOH, nous nous attarderons sur les caractéristiques des deux vitamines impliquées dans la génération d'AscOOH et le mécanisme par lequel elles interagissent.

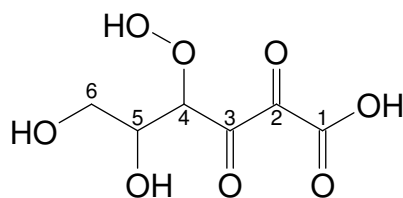


FIGURE 2. Structure proposée de l'ascorbylperoxyde [4].

1.2.3.1. La vitamine C

L'acide L-ascorbique, communément appelé vitamine C, est une molécule mythique à la fois universellement connue, reconnue et méconnue. Il suffit de constater le nombre de revues de littérature et d'articles scientifiques sur le sujet qui sont publiés encore aujourd'hui. Donneur d'électron(s), labile mais recyclable, hydrosoluble; ses propriétés chimiques permettent à l'acide ascorbique d'être l'un des antioxydants non enzymatiques majeurs dans le milieu intra- et extracellulaire [66-68]. Ce puissant agent réducteur jouit de propriétés physiologiques importantes, sinon vitales [69, 70]. C'est donc sans surprise que l'on retrouve la vitamine C dans les solutions d'HAIIV.

Comme son nom chimique l'indique (2-oxo-L-threo-hexono-1,4-lactone-2,3-enediol [71]), l'acide ascorbique (AscH_2) est une petite molécule à six carbones avec une structure cyclique cétolactone (Figure 60 en annexe, p.117). Sa masse moléculaire est de 176,1g/mol [70]. L' AscH_2 est un acide faible, ou plutôt un diacide, et par conséquent le pH influence sa forme et sa stabilité [71]. En solution à pH neutre, la vitamine C est majoritairement (>99,9%) retrouvée sous forme anionique [72]; on parle alors d'ascorbate (AscH^-).

Le double lien reliant les carbones 2 et 3 permet de céder séquentiellement et relativement facilement deux de ses électrons (Figure 60 en annexe, p.117) [66, 69]. Ceci fait de l'acide ascorbique un excellent agent réducteur – un antioxydant – et ses propriétés physiologiques gravitent autour de cette propriété [66, 69]. La cascade de dégradation oxydative non-enzymatique classique de l'ascorbate est très bien documentée [68, 70, 73-76] et passe par les intermédiaires déshydroascorbate (DHA) et acide dicétogulonique (DKG) (Figure 60 en annexe, p.117). Néanmoins, selon l'oxygénation et le pH du milieu, la dégradation de l' AscH_2 peut ne pas passer par ces intermédiaires, et plutôt via une dégradation non oxydative [68]. La cascade devient alors très complexe et peut générer une panoplie de produits à cinq carbones ou moins, tels que le furfural, l'oxalate, le L-érythrose, le L-xylose, le thréonate, etc. (Figure 3) [68, 73, 74].

En donnant un premier électron, l'oxydation de l'acide ascorbique passe par un intermédiaire radicalaire, le radical ascorbyle ($\text{Asc}\cdot^-$). À cause de sa constante de dissociation, en solution ce radical est à l'état anionique [77]. L' $\text{Asc}\cdot^-$ est, relativement aux radicaux libres conventionnels, peu réactif malgré son électron libre [66, 69, 77]. Dans la poursuite de cette voie de dégradation oxydative bien caractérisée, l'intermédiaire radicalaire peut soit céder un second électron au profit d'un oxydant, soit se dimériser et

dismuter [77]. L'oxydation supplémentaire à un électron de l'Asc \bullet^- engendre le DHA, principal produit de l'oxydation de l'ascorbate. Quant à la dismutation, elle se produit quand deux molécules d'Asc \bullet^- s'associent, en présence de H $^+$, pour se réarranger en une molécule d'ascorbate et une molécule de DHA [67, 77, 78].

Le DHA prend diverses formes hydratées en solution [79, 80] et, à cause de ses groupements cétones, y est instable. Ainsi, cet intermédiaire, avec une demi-vie d'une vingtaine de minutes à pH 7 [81], est vite hydrolysé irréversiblement en DKG [66]. Il y a alors ouverture du cycle lactone. Toutefois, à pH acide, le DHA est plus stable [81, 82]. *In vivo*, le DHA peut être recyclé via une réduction à deux électrons effectuée par certaines réductases ou de façon non-enzymatique par le glutathion (GSH) [67, 73]. Le DKG, hydraté en solution, est aussi instable et emprunte différentes voies de dégradation : il se re-cyclise en 2,3- ou 3,4-enediol-DKG [83, 84], il est converti en tautomères ou subit la décarboxylation [81]. La dégradation du DKG est extrêmement variable voire imprévisible, et dépend largement des conditions du milieu. Les produits qui en résulte sont variés et relativement peu caractérisés (Figure 3) [69].

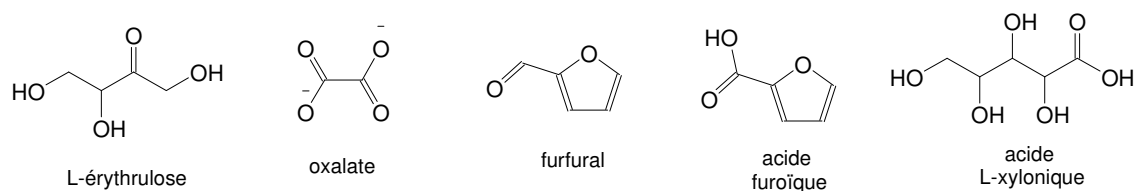


FIGURE 3. Certains produits de dégradation de la vitamine C, après l'intermédiaire DKG [4, 68, 71, 74, 84].

Comme l'acide ascorbique est une molécule labile, sa dégradation en solution est influencée par plusieurs facteurs physico-chimiques tels la surface d'exposition à l'air, la présence d'oxygène dissous, la lumière, la chaleur, le pH et la présence de métaux de transitions [71].

Somme toute, la vitamine C est une dénomination qui englobe les formes AscH $_2$, AscH $^-$ et DHA, soit les molécules qui disposent des propriétés vitaminiques [71]. Ce micronutriment est un excellent antioxydant par son potentiel redox et ses propriétés biochimiques [69]. Cette nature permet à l'ascorbate de remplir plusieurs fonctions réductrices au niveau enzymatique (comme cofacteur) et non enzymatique [69, 70]. Ces fonctions physiologiques sont nombreuses, variées et souvent partiellement caractérisées [69].

De fait, l'ascorbate est donneur d'électron pour au moins huit enzymes chez les mammifères; des monooxygénases et dioxygénases [69, 71]. Ces enzymes incorporent une ou deux molécules d'oxygène, ou bien un groupement hydroxyle, à un substrat [69]. Elles participent notamment à la biosynthèse du collagène, de la carnitine, de la norépinephrine, à l'amidation de protéines, à la conversion du cholestérol en acide biliaire, ainsi qu'au métabolisme de la tyrosine [69, 71]. Récemment, il a aussi été montré que l'AscH⁻ était nécessaire pour la dégradation par hydroxylation du facteur de transcription inductible par l'hypoxie (HIF-1) [85]. La stabilisation et l'activation de HIF-1 accroît l'expression, entre autres, de gènes d'enzymes glycolytiques, de facteurs angiogéniques, et de protéines de survie cellulaire [85]. En fait, globalement, l'ascorbate garde réduit l'ion métallique des oxygénases, maintenant ainsi leur activité [71]. On pense que les symptômes du scorbut, ou déficience en vitamine C, est liée au mauvais fonctionnement de certaines de ces enzymes [69].

En outre, il a été démontré que la vitamine C pouvait réguler la transcription génique et était impliquée dans la stabilisation de l'ARN de plusieurs gènes dont celui du collagène, de l'élastine, de l'acétylcholine, du cytochrome P450, de tyrosine hydroxylase, et des ubiquitines [69].

Sinon, dans des modèles cellulaires, *in vitro*, il a été montré que la vitamine C était un antioxydant de premier choix dans les milieux intra- et extracellulaire [69]. Les espèces chimiques qui sont préférentiellement réduites par l'ascorbate peuvent être divisées en quatre groupes, tel que classifié par Padayatty *et al.* [66]. On retrouve d'abord les composés avec un électron non apparié, comme les radicaux dérivant de l'oxygène, du soufre ou de l'azote. Puis, il y a les espèces réactives mais non radicalaires comme l'acide hypochloreux, l'ozone ou les nitrosamines. La troisième classe se compose des produits de réactions des espèces réactives. Par exemple, le tocophérol (vitamine E), qui s'oxyde pour protéger les lipides de la peroxydation, est recyclé par l'ascorbate. Enfin, l'ascorbate cède facilement ses électrons aux métaux de transitions (p.ex. fer, cuivre, titane, cobalt, chrome, nickel). Ainsi, dans le lumen intestinal, l'ascorbate favorise l'absorption du fer en le gardant à l'état réduit (ferreux, Fe²⁺) et en neutralisant les espèces réactives [69, 71].

On retrouve aussi dans la littérature une conjecture qui veut que la vitamine C aurait une action pro-oxydante. Cette hypothèse se fonde sur le fait que l'acide ascorbique, *in vitro*, est très efficace dans la réduction du fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺), ou tout

autre métal de transition. Ce dernier peut alors participer à la réaction de Fenton (Figure 4) et former des radicaux libres délétères pour les biomolécules [86]. *In vivo*, cette activité pro-oxydante reste à être démontrée et requière des ions métalliques non liés à des protéines [69, 86].

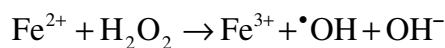


FIGURE 4. Équation de la réaction de Fenton [86, 87].

L'acide ascorbique est synthétisé par toutes les plantes chlorophylliennes et la plupart des animaux, par le foie et le rein, à partir du glucose ou du galactose [69, 71, 86, 88]. Les espèces pour lesquelles l'acide ascorbique est une vitamine sont notamment les insectes, les invertébrés, les poissons, les primates, les cobayes, certaines chauve-souris et l'humain [69, 71, 86, 89]. L'espèce humaine est dans l'incapacité de synthétiser cette molécule à cause de l'absence – évolutive – de la dernière enzyme de la cascade de biosynthèse, la gulono-lactone oxydase [70]. On doit combler ce manque par l'alimentation : surtout via la consommation de fruits et légumes [71].

Une fois ingéré, l'ascorbate est absorbé tel quel au niveau intestinal, jusqu'à saturation, et se retrouve dans la circulation (~ 20-80µM) à l'état non lié à des protéines [69, 71, 90]. C'est surtout sous forme ascorbate, et très peu sous forme DHA, que la vitamine C est retrouvée dans la circulation [91]. À partir du sang, la vitamine C se distribue librement dans l'espace extracellulaire, prête à être transportée et accumulée par les cellules [69]. Deux mécanismes permettent l'entrée de la vitamine C dans les cellules : le transport actif et spécifique de l'ascorbate par un transporteur sodium-dépendant (SVCT 1 et 2) et la diffusion facilitée du DHA par les transporteurs du glucose (GLUT 1 à 4) [90, 92]. Le DHA introduit est immédiatement réduit en ascorbate par les systèmes de recyclage cellulaire enzymatique et chimique [78], illustrés à la Figure 5. La plupart des cellules et tissus du corps accumulent la vitamine C dans l'ordre du millimolaire. Le surplus de vitamine C circulante est filtré par les glomérules rénaux pour ensuite être réabsorbé par le tubule contourné proximal jusqu'à saturation du système. L'excédant est excrété dans l'urine [69].

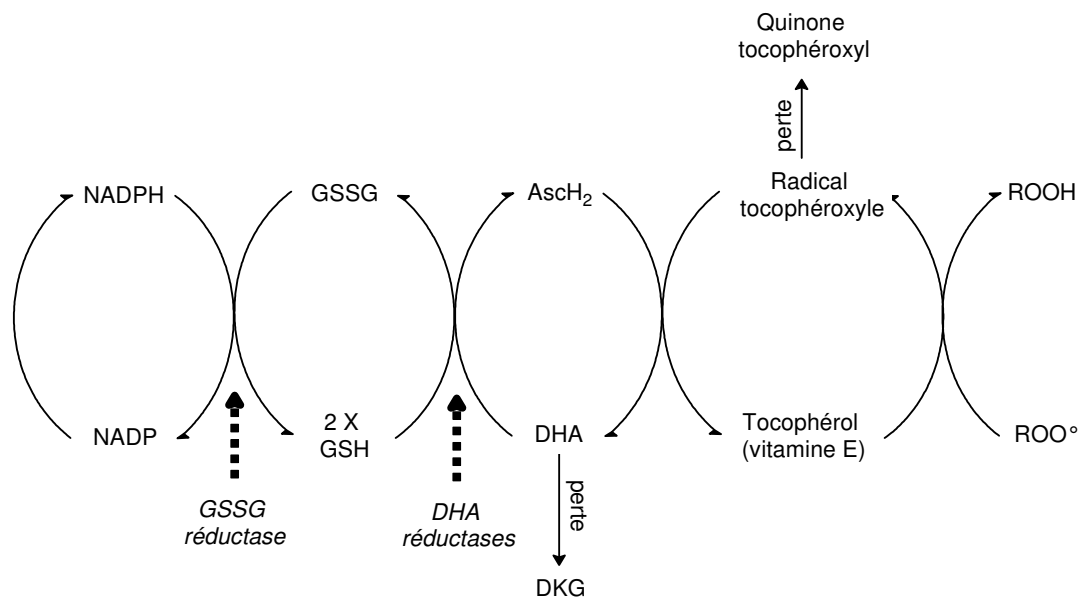


FIGURE 5. Système de recyclage des antioxydants cellulaires [63, 78, 86].

Toutefois, le système de recyclage du pool d'AscH⁻ *in vivo* est imparfait, sinon le scorbut n'existerait pas [66]. Le DHA hydrolysé en DKG n'est pas recyclé. Il est d'ailleurs connu que le bicarbonate plasmatique favorise le clivage du cycle lactone du DHA circulant [93]. Ainsi, une déplétion alimentaire en vitamine C de plusieurs semaines entraîne inévitablement une déficience caractérisée par une faible concentration plasmatique de vitamine C [69]. Cet état est aussi caractéristique de maladies associées au stress oxydant [94]. Même si le scorbut est rare aujourd'hui, de telles carences entraînent des symptômes sous-cliniques non spécifiques : irritabilité, hémorragies, enflures des jambes et des gencives, notamment [69]. Des cas d'enfants très carencés en vitamine C ont été rapportés récemment dans la littérature [95]. Ils étaient nourris de façon entérale avec du lait pasteurisé ou de formule, montrant que malgré un apparent équilibre nutritionnel apporté, des carences peuvent tout de même survenir. Ce jugement est d'autant plus pertinent que dans notre cas, la vitamine C de l'HAIV est très à risque de dégradation vu les conditions de son utilisation.

1.2.3.2. La riboflavine

Également présente dans les solutions d'HAIV, la riboflavine (Rf) ou vitamine B₂ est une molécule hydrosoluble précurseur du groupe des flavines. Les flavines ont de nombreuses fonctions physiologiques capitales. Elles sont avant tout, à l'instar de la vitamine C, d'importants donneurs d'électrons dans plusieurs réactions redox (p.ex. la β -oxydation) [96]. Les flavines sont impliquées dans le système hématopoïétique, la santé neurologique

et la vision, notamment [96]. Une carence en riboflavine chez une femelle gestante entraîne des malformations aux petits dans les modèles animaux [96]. Or, dans l'alimentation entérale humaine, les sources alimentaires sont plutôt nombreuses et diversifiées : produits laitiers, viandes et poissons, œufs, céréales enrichies, ainsi que certains légumes verts [96, 97].

La molécule de Rf peut subir la phosphorylation sur la fonction alcool de la chaîne latérale, devenant alors flavine mononucléotide (FMN), une coenzyme (Figure 6). L'ajout subséquent d'un groupe adénylate sur la chaîne latérale, via un lien pyrophosphate, transforme alors la FMN en flavine adénine dinucléotide (FAD). La FAD est une autre coenzyme, mais biologiquement ubiquitaire [97, 98]. Malgré leur nom, les FMN et FAD ne sont pas de réels nucléotides. En conditions physiologiques, les flavines se retrouvent principalement sous la forme FAD et FAD liée à des protéines (flavoprotéines) [99]. Ces flavoprotéines sont nombreuses, on en découvre encore chaque année [99]. Elles ont des rôles physiologiques essentiels et diversifiés, surtout au niveau de la régulation redox, par le transfert de 1 ou 2 électrons [97-99]. *In vivo*, la Rf libre reste rare, si ce n'est que c'est sous cette forme que se fait l'absorption intestinale (facilitée et passive selon la concentration). Des enzymes, kinases et phosphatases, se chargent ensuite des interconversions entre les différentes formes de flavines *in vivo* [97].

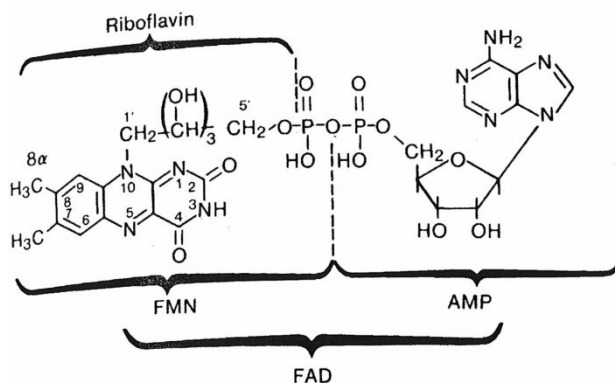


FIGURE 6. Structure des flavines. Tirée de [97].

Le groupe des flavines se caractérise par une structure de base tricyclique nommée noyau isoalloxazine [99] (Figure 6). La présence, sur ce noyau, d'une chaîne latérale à cinq carbones, dont quatre sont hydroxylés, caractérise la riboflavine. Le nom riboflavine provient d'ailleurs du fait de cette chaîne latérale semblable à un ribose et de la couleur jaune inhérente à la molécule (*flavus* en latin) [97]. Les flavines existent sous trois formes

redox en équilibre en solution : oxydée neutre (quinoïde), réduite d'un électron (semiquinone, un radical stable) ou réduite de 2 électrons [97, 100]. La structure de la Rf lui confère, sous forme oxydée neutre en solution, un caractère fluorescent lorsque excitée par la lumière UV et visible (Figure 7) [97, 98]. Cette photo réactivité, qui sera détaillée dans la prochaine section, est à l'origine de la labilité de la riboflavine, particulièrement au niveau de la chaîne latérale [97]. La photodégradation de la riboflavine engendre, selon le pH, deux espèces sans caractéristiques vitaminiques : la lumiflavine et la lumichrome [97, 98]. Protégée de la lumière, la riboflavine reste stable dans les solutions neutres ou légèrement acides [98].

Enfin, on constate ici l'ambivalence de la Rf. Cette vitamine est par définition vitale, mais possède aussi une structure absorbant la lumière qui pose de sérieux problèmes lors de son incorporation à l'HAIIV.

1.2.3.3. Photo-oxydation de l'ascorbate par la riboflavine

La plupart des molécules organiques n'absorbent pas le rayonnement électromagnétique solaire de façon à modifier leur structure ou activité [99]. Si c'est le cas, notamment pour les acides aminés tels que le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine, l'absorption se fait surtout dans le spectre ultraviolet (UV), qui constitue un faible pourcentage de la radiation solaire. D'autres molécules, tels les pigments de chlorophylle, ont une structure chimique permettant l'absorption de lumière visible. Or, ces composés qui ont la capacité d'absorber l'énergie de la lumière visible et/ou UV peuvent, dans certains cas, transférer ce surplus d'énergie à d'autres molécules afin de retrouver leur état fondamental [101]. On parle alors de photosensibilisants, car ils ont la capacité de photo-modifier des biomolécules autrement stables vis-à-vis de l'énergie lumineuse [99].

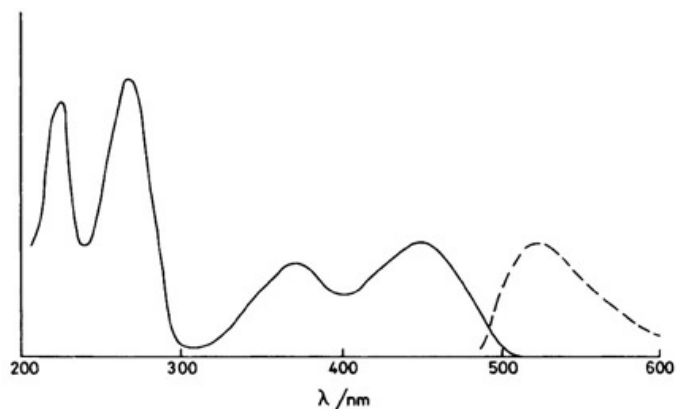


FIGURE 7. Spectre d'absorption (ligne pleine) et de fluorescence (tirets) de la riboflavine dans une solution aqueuse neutre. Tiré de [102].

La Rf, à cause de ses triènes et double liaisons (Figure 6), est un bon photosensibilisant [101]. Après absorption d'énergie électromagnétique UV ou visible (Figure 7), la Rf se retrouve dans un état excité, où l'un de ses électrons acquiert une énergie supérieure sans toutefois changer de spin. Cet état est de courte durée, et le changement spontané de spin de l'électron excité amène la molécule à un état d'énergie moindre mais très réactif : l'état triplet excité. C'est à ce moment que la riboflavine peut libérer son énergie résiduelle, via deux types de mécanisme (type I et II, Figure 8), afin de retrouver l'état énergétique initial.

La photo-oxydation de type II se caractérise par le transfert d'énergie à l'oxygène moléculaire diradical (triplet) qui devient alors oxygène singulet, une forme non radicale mais très réactive et électrophile [72, 99, 101, 103]. Cette forme énergétique de l'oxygène peut réagir en moins de 700 μ secondes [101].

La photo-oxydation de type I implique quant à elle une interaction directe entre le photosensibilisant et un substrat en solution [99, 103]. Il y a alors génération d'un radical dû à la perte d'un atome d'hydrogène ou d'un électron au profit de la riboflavine [104]. On comprend donc que toute la chimie de la photosensibilisation se situe au niveau des électrons et de leur niveau d'énergie.

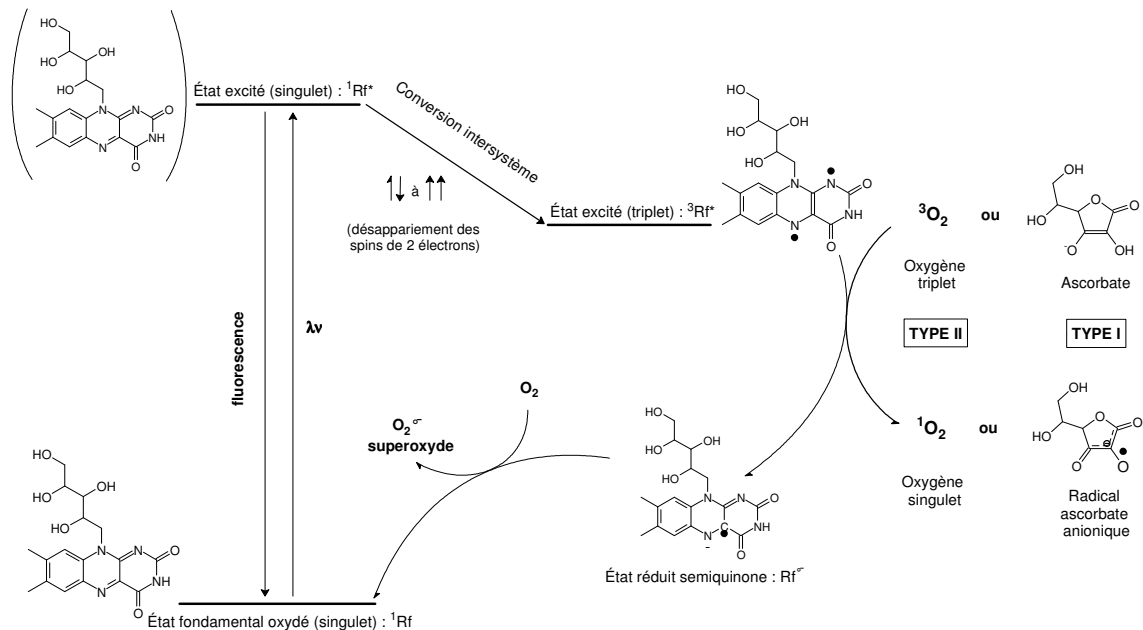


FIGURE 8. Schéma des mécanismes d'excitation et de désactivation de la riboflavine, adapté de [27, 72, 101, 105].

Fait intéressant, une molécule photosensibilisante comme la riboflavine peut transférer son énergie de cette manière à $10^3 - 10^5$ molécules avant d'être inactivée [101].

Étant donné le caractère photolabile de la Rf, l'épuisement de substrats réducteurs et de l'oxygène entraîne inévitablement sa photolyse, car la Rf ne peut alors plus désactiver son état énergisé [99, 104, 106]. Subséquemment, la Rf génère majoritairement l'un de ces deux produits : la lumichrome, si le pH est neutre ou légèrement acide, ou la lumiflavine, à pH plutôt basique [97, 98, 107]. À l'instar de leur molécule mère, la lumichrome et la lumiflavine sont tous deux photosensibilisants, à différents degrés [108]. Enfin, il est à noter que la Rf elle-même, ainsi que ses produits de dégradation, sont sensibles à l'oxygène singulet produit [108].

Dans les milieux organiques, la réaction de photosensibilisation de la Rf peut attaquer les acides aminés, les lipides, les vitamines [105, 108, 109], et même le glucose [110]. L'HAIV est donc un milieu propice à toute cette chimie [109], et on comprend qu'il est possible que des sous-produits résultent de l'interaction entre les composantes de l'HAIV sensibles à la Rf photo-excitée.

Depuis plusieurs décennies, de nombreuses équipes se sont intéressées aux réactions de photosensibilisation de la Rf, en particulier sur la photo-dégradation de l'acide ascorbique *in vitro* et dans des préparations alimentaires [4, 27, 99, 101, 103-106, 109-111]. Malgré la grande complexité de cette réaction photochimique, il est connu que l'oxydation de l'AsCH⁻ catalysée par la Rf triplet peut emprunter l'un et/ou l'autre des mécanismes photochimiques – type I ou II – selon les espèces en solution et les conditions expérimentales [103-108]. L'AsCH⁻, un donneur notoire d'électrons, est par le fait même un excellent désactivateur autant pour l'oxygène singulet que pour des photosensibilisants excités à l'état triplet [108].

Ainsi, Kim et coll. ont montré que, dans leur modèle de solution de Rf (1,2 ppm) et AsCH⁻ (120 µM) à pH 7,5, 81% de la photo-oxydation de l'ascorbate était dû à l'oxygène singulet généré [103]. Ces résultats sont consistants avec ceux de l'équipe de Buettner, notamment, qui rapportait en 2006 que l'AsCH⁻ et l'oxygène singulet réagissent rapidement pour former du H₂O₂ et du DHA ($k = 3,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ dans leurs conditions expérimentales) [72]. De plus, selon l'article de Kim *et al.*, la réaction photochimique est favorisée par une augmentation de l'intensité lumineuse, un pH moins acide (~ 7,5), et l'absence d'acides aminés compétiteurs comme substrat (la cystéine, p.ex.) [103]. La présence d'oxygène dissout est toutefois une condition inévitable pour que la réaction de photosensibilisation par la Rf passe par la voie de l'oxygène singulet [104].

D'autres scientifiques, utilisant des modèles différents, ont plutôt remarqué que la photo-oxydation de l'ascorbate par la Rf à l'état triplet excité passait par le mécanisme de type I – par interaction directe [104-106, 109]. En étudiant la photo-oxydation des acides aminés par les flavines dans l'HAIV, García et coll. ont constaté que l'ascorbate empêchait la dégradation du tryptophane. Or, la photo-oxydation du tryptophane passe avant tout par un mécanisme de type I, ce qui a permis aux auteurs de conclure que c'était aussi le cas de l'ascorbate [109]. Kim *et al.* arrivent à la même conclusion dans leur étude utilisant la technique de résonance de spin électronique. Cette technologie détecte les électrons non appariés et a permis de mettre en évidence que le radical ascorbate anionique est majoritairement formé par interaction directe avec la Rf photo-excitée [104]. Enfin, le récent article de Cardoso et coll. est intéressant pour comprendre la mécanistique chimique de cette réaction photochimique [105].

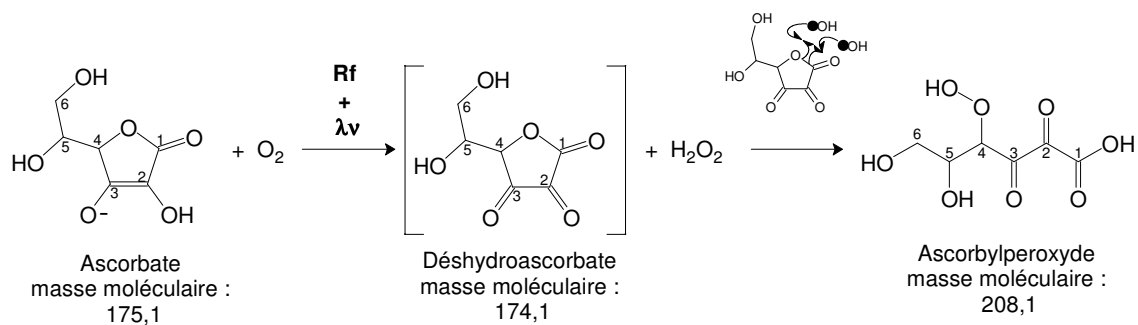


FIGURE 9. Photo-oxydation théorique de l'ascorbate en ascorbylperoxyde [4].

En ce qui concerne la réaction photochimique dans les solutions d'HAIV, on peut penser que l'AscH⁻ est photo-oxydé par un mélange des mécanismes de type I et II. Dans les deux cas, la réaction mène à l'épuisement de l'AscH⁻ dans le milieu et engendre les mêmes produits, i.e. du H₂O₂ et du DHA. Selon le modèle proposé par Knafo *et al.* en 2005, l'AscOOH est généré à la suite d'une attaque radicalaire par des radicaux hydroxyles qui ouvrent le cycle du DHA et y insèrent une fonction peroxyde pour en faire une molécule de masse moléculaire 208 [4]. Les radicaux hydroxyles •OH nécessaires sont en principe formés par la réaction entre des molécules de H₂O₂ et d'anion superoxyde générés dans ces solutions complexes [112]. Ainsi, on peut penser qu'il apparait une compétition en solution entre la formation de DKG (dégradation classique) et la génération d'AscOOH à partir du DHA [4]. Le schéma (Figure 9) permet de visualiser les changements de structure, alors qu'un résumé du modèle complet est présenté à la Figure 10.

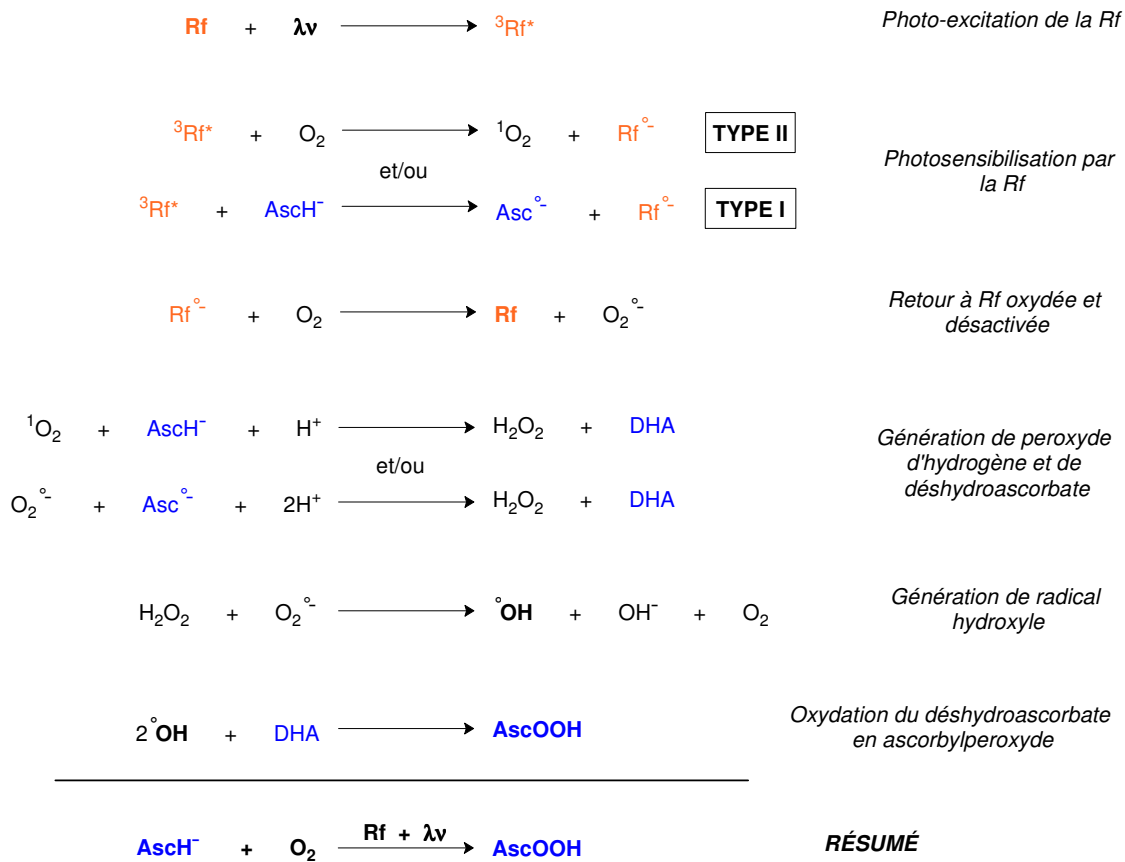


FIGURE 10. Réactions simplifiées proposées pour expliquer la génération d'AscOOH dans les solutions d'HAIV. AscH⁻, ascorbate ; Asc^{•-}, radical ascorbate anionique ; DHA, déshydroascorbate ; AscOOH, ascorbylperoxyde [4, 26, 27, 72, 100, 104, 107, 112].

Plusieurs données du laboratoire ont permis de formuler ce modèle. D'abord, il fut montré en 1997 que la génération de peroxydes organiques et inorganiques dans l'HAIV était principalement due à l'exposition à la lumière des multivitamines (MV) [6]. Puis, des analyses par spectrométrie de masse effectuées sur des solutions de MV photo-exposées ont indiqué une dégradation de l'AscH⁻ et la génération en majorité d'une molécule de masse moléculaire 208, ainsi que de sa molécule fille de masse moléculaire 136 [53]. La fragmentation de la molécule 208, en spectrométrie de masse (MS), a permis d'établir ce rapport entre 136 et 208. L'exposition à la lumière de solutions contenant seulement de l'AscH⁻ et de la Rf, à pH neutre, a montré par analyse MS des spectres identiques à ceux des molécules initiales [53]. Le modèle de génération de la molécule 208 par hydrolyse du DHA via des radicaux hydroxyles a été élaboré grâce au fait que la Rf photo-excitée peut être remplacée par du H₂O₂ et du fer ferreux (Fe²⁺) pour catalyser la même réaction en produisant les mêmes produits [53]. Le H₂O₂ seul n'induit pas cette réaction. Or, il est connu que le H₂O₂ et le Fe²⁺ génèrent du •OH par réaction de Fenton [87].

En outre, la seule autre référence à un produit de dégradation de la vitamine C de poids moléculaire 208 provient de deux articles de Deutsch *et al.* [75, 76]. Les auteurs rapportent qu'en mélangeant de l'AscH⁻ ou du DHA (0,3 à 60mM) avec du H₂O₂ (30 à 9 000mM), il y a formation de deux produits de masses moléculaire 136 et 208. Ces molécules dériveraient du DKG, elles ont alors été identifiées comme acide thréonique (136) et acide 4,5,5,6-tétrahydroxy-2,3-dicétohexanoïque (THDH; 208) (Figure 11) [76]. Dans ce cadre expérimental, les concentrations sont largement supérieures à celles retrouvées dans les solutions d'HAIIV. Ceci permet de penser que ces molécules sont distinctes de celles décrites par notre laboratoire.

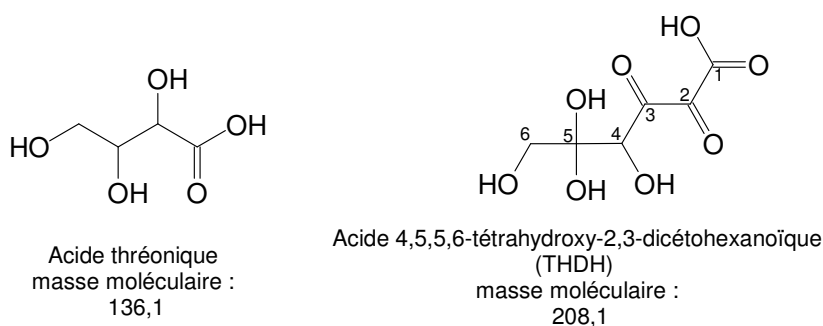


FIGURE 11. Structure des molécules 136 et 208 suggérées par Deutsch *et al.* [4, 76].

Dans notre cas, la structure peroxydée de l'AscOOH (Figure 2, page 14) a été déduite du fait que le ratio de l'ion 208 produit par rapport à la quantité initiale d'AscH⁻ correspond à la quantité de peroxydes organiques, i.e. résistants à la catalase, générés par la réaction photochimique AscH⁻-Rf [53]. De plus, le métabisulfite de sodium, un réducteur de fonctions peroxydes [113, 114], réduit tous les peroxydes formés par la réaction, incluant une partie de l'AscOOH. Le métabisulfite empêche aussi la réaction s'il est ajouté initialement [4, 53].

Plus récemment, des expériences *in vitro* ont confirmé l'effet positif du temps, de la Rf et de la lumière sur la génération d'AscOOH à partir d'AscH₂ en solution [4]. Pour différencier la molécule 136 – parente à la molécule 208 – de l'acide thréonique commercial, la fragmentation au MS a encore été utilisée [4]. Les résultats ont montré des spectres de fragmentation différents pour les deux molécules.

1.2.4. Espèces redox et produits de dégradation : leurs rôles physiologiques

La charge oxydante de l'HAIV comprend donc des quantités non négligeables de H_2O_2 , de lipoperoxydes, de produits de la peroxydation lipidique et d'AscOOH, sans compter ce qui n'a pas encore été découvert. On l'a dit : il est raisonnable de penser que ces molécules ne sont pas inoffensives lorsqu'infusées aux nouveau-nés. D'ailleurs, l'administration d'HAIV a été associée à l'augmentation de l'activité radicalaire *in vivo* [65]. De plus, la littérature abonde de plus en plus quant aux effets biologiques des espèces réactives en jeu ici.

D'abord, les radicaux libres produits dans les sacs d'HAIV lors de sa photo-exposition (Figure 10, page 25), vue leur grande réactivité, ne se rendent probablement pas à l'enfant. Rappelons qu'un radical est une molécule qui contient un ou plusieurs électrons non appariés sur leur orbitale [56]. Selon son degré de réactivité, un radical peut soit céder ou arracher un électron à un substrat, ou alors se greffer à un non-radical qui devient alors radical [56]. Par exemple, le très réactif radical hydroxyle attaque souvent les biomolécules en leur soutirant un atome d'hydrogène – l'hydrogène avec son unique proton et électron est d'ailleurs radicalaire – comme dans le cas de la peroxydation lipidique [56, 115]. Il est connu que $\bullet OH$ est instable et oxyde toute molécule à proximité de façon non spécifique; l'ADN, les lipides, les protéines en sont des substrats en conditions physiologiques [56, 60, 116]. Une molécule $\bullet OH$ libre n'est donc pas concevable [59]. L'anion superoxyde ($O_2\bullet^-$) est moins réactif; il peut diffuser modérément avant de rencontrer une cible (i.e. certaines protéines), il peut se dismuter en H_2O_2 ou réagir avec l'oxyde nitrique pour générer le peroxyde nitrite [56, 59, 60]. L'anion superoxyde peut aussi réagir avec du H_2O_2 pour former des radicaux hydroxyles [60]. L'action biologique des radicaux libres générés tels $\bullet OH$ et $O_2\bullet^-$ passe donc plutôt par les réactions qui génèrent, dans l'HAIV, des produits de peroxydation lipidique, du H_2O_2 , des peroxyde nitrites et de l'AscOOH. Ces dernières molécules ont tous potentiellement des effets physiologiques plus spécifiques [4, 117].

La modification protéique au niveau de résidus cystéine critiques (avec un groupement $-SH$) est, avec la phosphorylation, la manière principale par laquelle la signalisation protéique s'opère [118]. H_2O_2 et certains produits aldéhydiques de la peroxydation lipidique peuvent modifier des protéines de façon spécifique en oxydant les fonctions thiols [116, 119]. Cette oxydation peut changer la conformation de la protéine, son activité et ses interactions avec d'autres protéines de façon à perturber la signalisation

cellulaire [116]. Par exemple, des concentrations physiologiques de HNE peuvent moduler la cascade de signalisation de l'isoforme β de la protéine kinase C (PKC) en augmentant son activité. Il semble que cet aldéhyde interagisse directement avec des résidus cystéines du domaine régulateur et catalytique de la PKC [120]. Également, il a été démontré que H_2O_2 altère des protéines tyrosine phosphatases (PTPases) impliquées dans le métabolisme cellulaire, la prolifération, la différenciation et la transformation oncogénique, en oxydant deux résidus cystéine du site catalytique [121].

Il est rapporté que le MDA et le HNE sont mutagènes [19]. Des concentrations aussi basses que 1pM de lipoperoxydes stimulent l'activité des cyclooxygénases qui catalysent la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines, ces médiateurs physiologiques importants qui favorisent notamment l'inflammation [19, 56, 122]. Les produits aldéhydiques comme le MDA et le HNE forment facilement des adduits avec des protéines, comme l'apolipoprotéine B ou la C-Jun N-Terminal Kinase (JNK), au niveau de certains acides aminés précis [119]. Ces modifications altèrent l'activité protéique. Finalement, il est également rapporté que certains produits de la peroxydation lipidique peuvent déclencher une réponse immunitaire, initier la fibrose, l'inflammation, inciter la transcription génique ou induire l'apoptose [62].

La cytotoxicité du H_2O_2 à hautes doses est connue depuis longtemps, alors qu'on découvre toujours plus de ses fonctions cellulaires plus subtiles comme messenger ou cofacteur aux doses physiologiques [60]. Les concentrations intracellulaires varient entre 0,001 et 0,7 μ M, alors que celles extracellulaires vont de 1 à 10 μ M [123]. Il y a généralement un facteur dix entre les concentrations intra- et extracellulaires en H_2O_2 [123]. Au niveau métabolique, des concentrations en H_2O_2 semblables à celles retrouvées dans l'HAIV engendrent un accroissement rapide du transport de glucose dans plusieurs types cellulaires exprimant GLUT-1 *in vitro* [124]. En 1979, alors qu'il était déjà connu que comme l'insuline, H_2O_2 stimulait la voie des pentoses, le transport du glucose, l'oxydation du glucose et la synthèse de glycogène dans des modèles cellulaires animaux, May et de Haen ont montré que H_2O_2 favorisait aussi la synthèse d'acides gras et activait la pyruvate déshydrogénase [125]. H_2O_2 serait aussi impliqué dans la fibrose en favorisant la transcription du gène du collagène [126]. Au niveau de la signalisation cellulaire, une récente revue de la littérature rapportait plusieurs capacités d'interaction de H_2O_2 avec : les récepteurs aux facteurs de croissance PDGF et EGF, les pompes à calcium du réticulum

endoplasmique, la Big MAPK-1 (BMK-1), la voie de JNK via TNF- α et IL-1, des protéine tyrosine phosphatases (PTPases), etc. [127]. En agissant de la sorte sur des seconds messagers – kinases, phosphatases et récepteurs –, H₂O₂ devient un transducteur de signal et participe à la signalisation cellulaire, ce processus qui mène à des réponses physiologiques comme l'expression génique, la prolifération, la sécrétion, la motilité, et la neurotransmission [128]. Considérant le caractère ambivalent du H₂O₂, on comprend qu'il doit exister une régulation cellulaire étroite pour ne pas ni l'éliminer complètement ni perdre le contrôle [55, 57, 129].

En outre, alors que notre laboratoire cherche à déterminer un effet biologique de l'AscOOH, il est connu que l'AscH⁻ et certains autres produits de dégradation de l'AscH⁻ – probablement présents dans l'HAIIV – peuvent perturber des phénomènes physiologiques. Par exemple, dans certaines conditions l'AscH⁻ peut provoquer l'ascorbylation de protéines, i.e. la formation de liens covalents en générant des adduits par une réaction dite de Maillard [130]. En outre, il a été montré que le DHA était capable d'inactiver de façon irréversible l'hexokinase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, des enzymes de la glycolyse [131]. Le mécanisme d'inactivation de l'hexokinase déduit consiste en une liaison covalente du DHA avec les fonctions thiols de certaines cystéines de l'enzyme [131]. En fait, le DHA est potentiellement toxique et certains de ses produits de dégradation sont très électrophiles et provoquent la glycation de protéines [88, 91]. Par ailleurs, il est possible que la combinaison d'AscH⁻ et de H₂O₂ dans l'HAIIV puisse provoquer des dommages oxydatifs une fois dans la circulation via la réaction de Fenton. En effet, il a été montré récemment dans un modèle cellulaire que l'incubation de cette combinaison de molécules spécifiques produisait un pattern unique d'attaques sur l'ADN [132]. Les concentrations en vitamine C utilisées étaient de dix fois supérieures aux nôtres, mais le H₂O₂ (200 μ M) était dans les ordres de concentration retrouvés dans l'HAIIV. Finalement, dans le cas de l'AscOOH, sa structure qui comprend une fonction peroxyde et des données antérieures suggèrent qu'elle dispose d'un effet biochimique [4].

1.3. L'homéostasie redox chez l'humain

1.3.1. Les oxydants et antioxydants *in vivo*

Une constante production endogène d'espèces oxydantes se fait en conditions normales *in vivo*, et sont impliquées dans plusieurs processus physiologiques : réactions enzymatiques, transduction de signaux, activation de facteurs de transcription, expression génique... [116]. Les principales espèces oxydantes formées sont l'anion superoxyde et le H_2O_2 [56, 133]. En fait, l'anion superoxyde est considéré comme l'espèce oxydante « primaire » : il est généré par la réduction à un électron de l'oxygène moléculaire de façon enzymatique, via notamment la NAD(P)H oxydase et la xanthine oxydase, ou non enzymatique et accidentelle, via des stress cytotoxiques ou la fuite d'électrons durant leur transport mitochondrial (Figure 12) [56, 60, 63, 134]. La réduction subséquente de l'anion superoxyde, catalysée par une enzyme ou non, produit H_2O_2 [55]. En présence de fer ferreux (réduit par l'anion superoxyde notamment), H_2O_2 peut être réduit et générer le dangereux radical hydroxyle par la réaction de Fenton [56, 63]. Conséquemment, pour ne pas perdre le contrôle de ces réactions générant des oxydants, les cellules ont évoluées en développant des défenses antioxydantes et des systèmes de réparation, qui ne sont toutefois pas efficaces à 100% [56]. Ces systèmes de défense peuvent être divisés en enzymes, protéines, vitamines et autres molécules [133, 135]. Ces défenses peuvent être extra- ou intracellulaire [40].

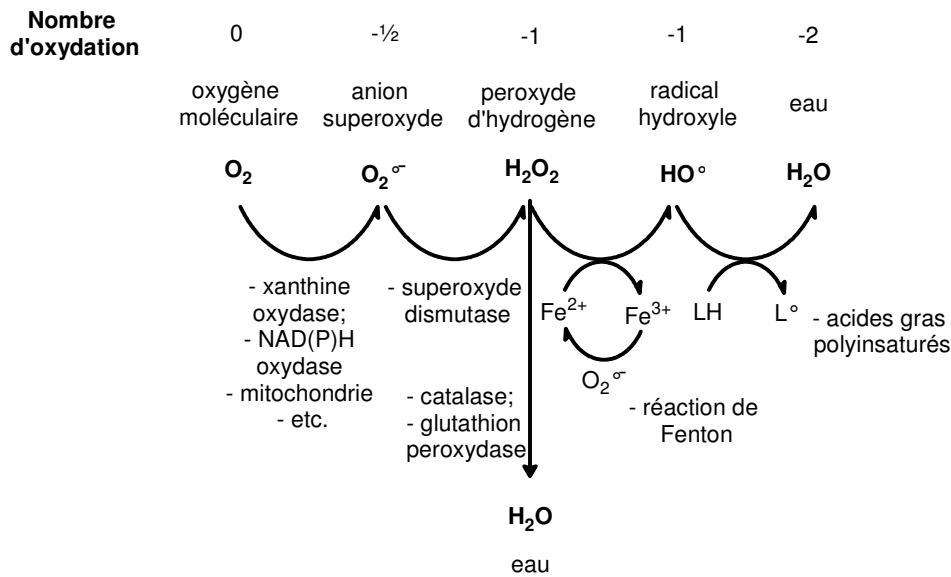


FIGURE 12. Formation des espèces oxydantes *in vivo* à partir de la réduction de l'oxygène, et la gestion cellulaire pour régulariser leurs concentrations, adapté de [55, 63].

Le statut redox cellulaire est un terme global qui désigne la balance entre l'ensemble des niveaux d'oxydation et de réduction dans la cellule [117]. Schafer et Buettner ont précisé le concept en 2001 : le statut redox s'applique plutôt à un couple redox et se définit par son potentiel standard et sa capacité réductrice [118]. L'environnement redox d'une organelle, d'une cellule ou d'un tissu est la somme du statut redox de tous les couples présents. Or, le couple redox glutathion oxydé/réduit (GSSG/2GSH) étant le plus abondant dans la cellule, on peut utiliser son statut redox pour estimer l'environnement redox cytosolique [118]. L'état de la cellule – prolifération, différenciation, ou apoptose – est un reflet du degré de réduction du statut redox du couple GSSG/2GSH [118]. Le glutathion est, en terme de concentration, la principale molécule non protéique contenant un groupement sulfhydrile [133]. Ces groupements prennent soit la forme réduite de fonction thiol (-SH), ou thiolate (-S⁻) si déprotoné à certains pH, soit la forme oxydée disulfure (-S-S-) par une liaison covalente entre deux fonctions thiols [118]. Les protéines contiennent pour la plupart des groupements sulfhydriles, par leurs résidus cystéines, et l'oxydation du thiol ou la réduction du pont disulfure initial peut modifier l'activité de la protéine [118]. D'où l'importance de la régulation du redox cellulaire.

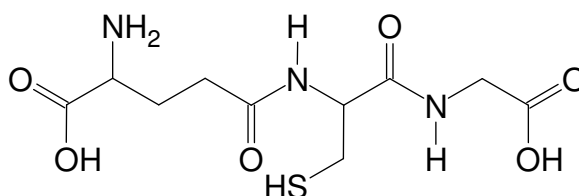


FIGURE 13. Structure du GSH [117, 118].

Le glutathion (GSH) est un tripeptide (Figure 13) qui se retrouve dans les cellules en concentrations de l'ordre du millimolaire [136]. Son site actif est sa fonction thiol [137]. Il participe activement à la défense antioxydante par son rôle de cofacteur pour des enzymes de détoxification. Par exemple, la glutathion peroxydase utilise le GSH pour réduire H₂O₂ et la glutathion-S-transférase catalyse la conjugaison du GSH avec des xénobiotiques et des produits de peroxydation lipidique [133]. GSH neutralise directement le radical hydroxyle, l'anion superoxyde et l'oxygène singulet de façon chimique, et participe à la régénération des vitamines antioxydantes C et E (Figure 5, p.19) [63]. Il est rapporté qu'un abaissement des niveaux de GSH est associé à une cytotoxicité et à certaines maladies [136]. Le GSH est synthétisé *de novo* à partir des acides aminés cystéine, glutamate et glycine, par les enzymes γ -glutamylcystéine ligase (GCL) et glutathion synthétase (GS) dans le cytosol de toute cellule [117, 118, 133]. Le turnover est très rapide, particulièrement dans les

hépatocytes et les érythrocytes [137]. Le ratio cellulaire global entre GSH/GSSG est habituellement compris entre 30:1 et plus de 100:1, mais il varie beaucoup selon l'organelle étant donné que certaines conservent un pool et un ratio indépendant du cytosol, comme le réticulum endoplasmique où le redox est très oxydé [118]. Le GSSG est régénéré en GSH par l'action de la glutathion réductase (GR) qui utilise le NADPH comme réducteur [60]. La saturation des GR provoque l'exportation du GSSG excédentaire [136]. Finalement, il est à noter que le plasma contient peu de GSH avec des concentrations de l'ordre du micromolaire [137].

Parmi les principales enzymes antioxydantes, on retrouve la superoxyde dismutase (SOD) qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en O_2 et en H_2O_2 [138]. Cette métalloprotéine existe sous au moins trois formes : la Cu/Zn-SOD cytoplasmique, la Mn-SOD mitochondriale et la SOD extracellulaire (EC-SOD) [59, 60, 138]. La catalase, qui se retrouve principalement dans les peroxysomes et les mitochondries, catalyse la dismutation du H_2O_2 en H_2O et en O_2 [59, 60]. Les autres compartiments cellulaires réduisent H_2O_2 via des enzymes qui utilisent des thiols comme agent réducteur, à l'instar de la glutathion peroxydase (GPx) [59]. Les GPx sont une famille de sélénoprotéines plasmiques, cytosoliques et mitochondriales qui catalysent la réduction de H_2O_2 en oxydant deux molécules de GSH pour former une molécule de GSSG [60, 117]. Elles possèdent une spécificité générale pour les hydroperoxydes, mais une spécificité élevée pour le GSH [60]. Les thiorédoxine (Trx) peroxydases, ou peroxyrédoxines, sont aussi un groupe de peroxydases ubiquitaires à basse efficacité utilisant des co-substrats spécifiques comme le GSH et la thiorédoxine. Elles sont aussi impliquées dans la signalisation cellulaire [129, 139]. Toutefois, dans les érythrocytes, la catalase reste la première ligne de défense contre le H_2O_2 intracellulaire et même extracellulaire (plasmatique) [140].

Quant aux vitamines antioxydantes, elles se composent des vitamines A, C, et E [22]. Nous avons déjà survolé les propriétés antioxydantes de la vitamine C hydrosoluble. La vitamine E est un terme collectif qui regroupe l' α -tocophérol (Figure 14) et ses dérivés tocots et tocotriénols aux propriétés antioxydantes [141]. La vitamine E est liposoluble; on la retrouve donc dans les lipoprotéines et les membranes [141]. Son rôle antioxydant principal est de protéger les acides gras insaturés contre l'oxydation (Figure 59 en annexe, p.116) [141]. En fait, elle brise la chaîne de peroxydation lipidique en neutralisant les radicaux peroxyles $LOO\bullet$ par sa fonction hydroxyle. Le radical tocophéroxyle résultant a

une structure qui lui permet d'émerger de la membrane et d'être recyclé par la vitamine C (Figure 5, p.19) [141]. La vitamine A (Figure 14), également liposoluble, est aussi une expression collective désignant les trois formes retrouvées *in vivo* (rétinol, rétinol et acide rétinolique), ainsi que les quelques 50 caroténoïdes qui possèdent une activité provitamine A [142]. Le pouvoir antioxydant de la vitamine A repose sur sa chaîne de polyènes qui permet de neutraliser l'oxygène singulet, et les radicaux thiyles ($-S\bullet$) et peroxydes [142]. Il est important de garder à l'esprit que les vitamines sont anti-radicaux, et non anti-peroxydes [23].

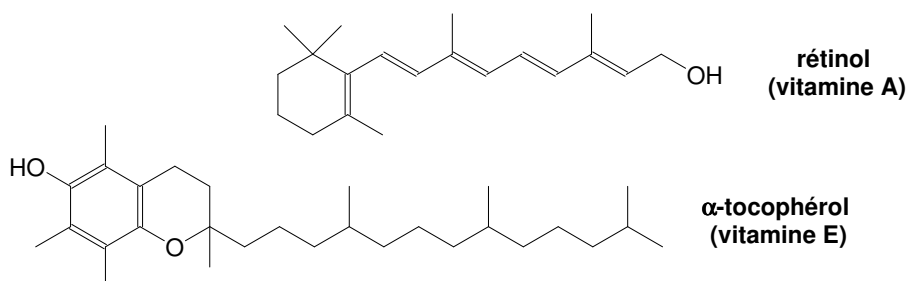


FIGURE 14. Vitamines antioxydantes liposolubles [141, 142].

1.3.2. L'effet de la prématurité sur la défense antioxydante

Il est connu que les nouveau-nés prématurés possèdent des défenses immatures contre les espèces chimiques réactives discutées précédemment [12]. De plus, la maladie et les complications aggravent ce déséquilibre redox en nécessitant des traitements oxydants comme la ventilation assistée et la nutrition parentérale [143]. Plusieurs études chez l'animal et l'humain ont permis de mesurer l'immaturité au niveau de certains paramètres de la protection antioxydante.

Dans des modèles animaux, il a été montré, en 1987, que le développement intra-utérin des antioxydants enzymatiques SOD, catalase, and GPx, s'accélérait dans les derniers 10% de la durée de la gestation [144]. En fait, même les nouveau-nés humains ont des niveaux plasmatiques en sélénium et en GPx – une sélénoprotéine – abaissés par rapport aux adultes, et la prématurité accentue cette baisse [145, 146]. Les niveaux de vitamines A, C et E sériques du bébé prématuré sont significativement plus bas que ceux du nourrisson né à terme [22]. Il semble donc que ces vitamines s'accumulent davantage durant le troisième trimestre de gestation. En outre, la concentration plasmatique en cystéine corrèle avec l'âge gestationnel [133]. Comme les prématurés sont en relative carence en cystéine, il apparaît que la synthèse de GSH est inadéquate et elle augmente donc durant la

première semaine de vie [133]. D'ailleurs, Lavoie *et al.* avaient déjà montré auparavant l'effet de l'âge gestationnel sur la quantité totale de glutathion (oxydé et réduit), ainsi que sur l'activité de la GR chez l'enfant [136]. Récemment, Chou et Lee ont dressé un profil de quelques antioxydants plasmatiques chez le prématuré versus l'enfant né à terme, divisés selon le poids à la naissance [135]. Malgré un design expérimental et des résultats compliqués, ils ont observés, par exemple, que l'activité de la catalase suivait l'âge gestationnel et le poids à la naissance. Ainsi, cette activité était significativement plus élevée chez les enfants nés à terme de poids normal par rapport à celle mesurée chez les enfants prématurés et de faible poids. Un petit âge gestationnel ainsi qu'un faible poids de naissance était aussi associé à des niveaux plasmatiques en vitamine A abaissés.

Finalement, un dernier exemple illustre bien que la défense antioxydante des bébés prématurés est immature. En effet, ces patients reçoivent des doses micromolaires de H_2O_2 par voie intraveineuse via l'HAIV. C'est principalement la catalase érythrocytaire qui détoxifie ce peroxyde au niveau extracellulaire (plasmatique) [140]. Comme la catalase érythrocytaire du nouveau-né a une activité significativement plus basse que celle de l'adulte [147], il est normal que ses globules rouges soient plus sensible à l'hémolyse par action du H_2O_2 [146] et que l'on retrouve par le fait même, beaucoup de peroxydes dans l'urine des bébés sous HAIV [28].

1.4. Voies métaboliques

1.4.1. Aperçu du métabolisme énergétique hépatique étudié

Étant donné que notre étude de l'effet de l'AscOOH était dirigée sur le foie, un bref survol de son métabolisme est nécessaire pour souligner les concepts importants.

Il est bien établi que le foie a un rôle central dans la régulation des métabolismes glucidique et lipidique de l'énergie (Figure 15, p.36) [148]. Sommairement, suivant un repas, le glucose circulant qui entre dans l'hépatocyte via l'un des transporteurs de glucose (GLUT2 surtout [148]) est d'abord phosphorylé par une hexokinase ou une glucokinase. Cette dernière, par rapport à l'hexokinase, est spécifique au foie et son affinité basse est adaptée aux hautes concentrations de glucose transporté. En outre, le glucose-6-phosphate (G6P) généré est ensuite destiné à la glycogénèse. Lorsque les réserves de glycogène sont rétablies, le G6P suit la voie des pentoses phosphates pour générer le NADPH nécessaire à

la lipogenèse. Parallèlement, le G6P suit la voie de la glycolyse qui produit deux molécules de pyruvate. Le pyruvate accède à la mitochondrie où la pyruvate déshydrogénase le transforme en acétyl-CoA et régule ainsi son entrée dans le cycle de Krebs. L'acétyl-CoA y fait un bref passage pour être incorporé notamment en citrate qui retourne au cytosol afin de suivre la voie de la lipogenèse. Les acides gras sont estérifiés en triacylglycérols (TG), et exportés dans la circulation sous forme de lipoprotéine de très basse densité (VLDL) pour être stockés dans d'autres tissus spécialisés. Le foie conserve peu ses TG pour éviter la stéatose [148-151]. Les TG sont des lipides neutres qui sont des molécules de stockage intracellulaire. Lorsque la cellule en a besoin pour la β -oxydation ou la synthèse membranaire, elle clive ses TG sous l'action de lipases dont la triacylglycérol hydrolase (TGH) hépatique [151, 152].

Le métabolisme décrit ci-dessus représente le métabolisme adulte, mais aussi ce qui se passe *in utero* dans l'hépatocyte fœtal, i.e. la dégradation du glucose fournis par la mère, où l'hexokinase et les enzymes de la glycolyse fonctionnent à plein régime [153]. Le fœtus se prépare à la vie post-natale en stockant un maximum de glycogène en fin de gestation [153]. D'ailleurs, chez le rat, la TGH est indétectable dans le foie fœtal [154]. À la naissance, le passage à une alimentation riche en gras et faible en glucides provoque un ajustement des systèmes hormonaux qui favorisent l'adoption des voies métaboliques de la β -oxydation et de la néoglucogenèse [153]. Après le sevrage, la néoglucogenèse décline et le foie retourne en mode d'abondance glucidique [154]. Il est possible que l'infusion d'HAIV qui est riche en glucides perturbe le développement normal du métabolisme du prématuré.

L'acétyl-CoA carboxylase (ACC) est une enzyme qui participe à la régulation du pool de TG hépatiques, car elle catalyse la première étape de la synthèse d'acides gras [4, 150]. L'insuline, le glucagon, l'épinéphrine, ainsi que les niveaux de citrate, de palmitoyl et d'adénosine monophosphate (AMP) participent tous au contrôle par allostérie ou par phosphorylation de l'ACC [150]. De fait, la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) et la protéine phosphatase 2A (PP2A) sont sensibles à certaines des molécules nommées ci-haut et inactivent ou activent, respectivement, l'ACC [150, 155, 156]. La phosphorylation se fait sur des résidus sérines [155]. En outre, le malonyl-CoA généré par l'action de l'ACC a aussi un rôle dans la régulation du pool de TG hépatiques, en inhibant la carnitine palmitoyl-CoA transférase-1 (CPT-1). Cette enzyme est impliquée dans le transfert d'acides gras cytosoliques pour la β -oxydation mitochondriale [157].

Enfin, on a en glissé un mot précédemment : le redox influence aussi le métabolisme énergétique. Par exemple, il semble que H_2O_2 et GSSG inhibent PP2A, qui régule l'ACC, par altération de ses résidus cystéines [158]. Par ailleurs, HNE, un produit de peroxydation lipidique, est un puissant inhibiteur de la respiration cellulaire en partie via son inhibition de la pyruvate déshydrogénase (PDH) [159]. En outre, s'il est stabilisé par une condition hypoxique, le facteur HIF-1 active la transcription de plus de 70 gènes, dont ceux du métabolisme énergétique et du transport du glucose, notamment [160]. Or, même en condition normoxique, HIF-1 est sensible au statut redox cellulaire de telle sorte que même H_2O_2 peut le stabiliser et l'activer [160]. Du H_2O_2 exogène est aussi apte à accroître l'activité de transporteurs de glucose dans plusieurs modèles cellulaires [161, 162]. H_2O_2 inhibe également l'activité de l'hexokinase purifiée, de la même manière que le DHA le fait [131]. Finalement, il a été montré que l'AscOOH pourrait être impliqué dans la stimulation de l'ACC [4].

CIRCULATION SANGUINE

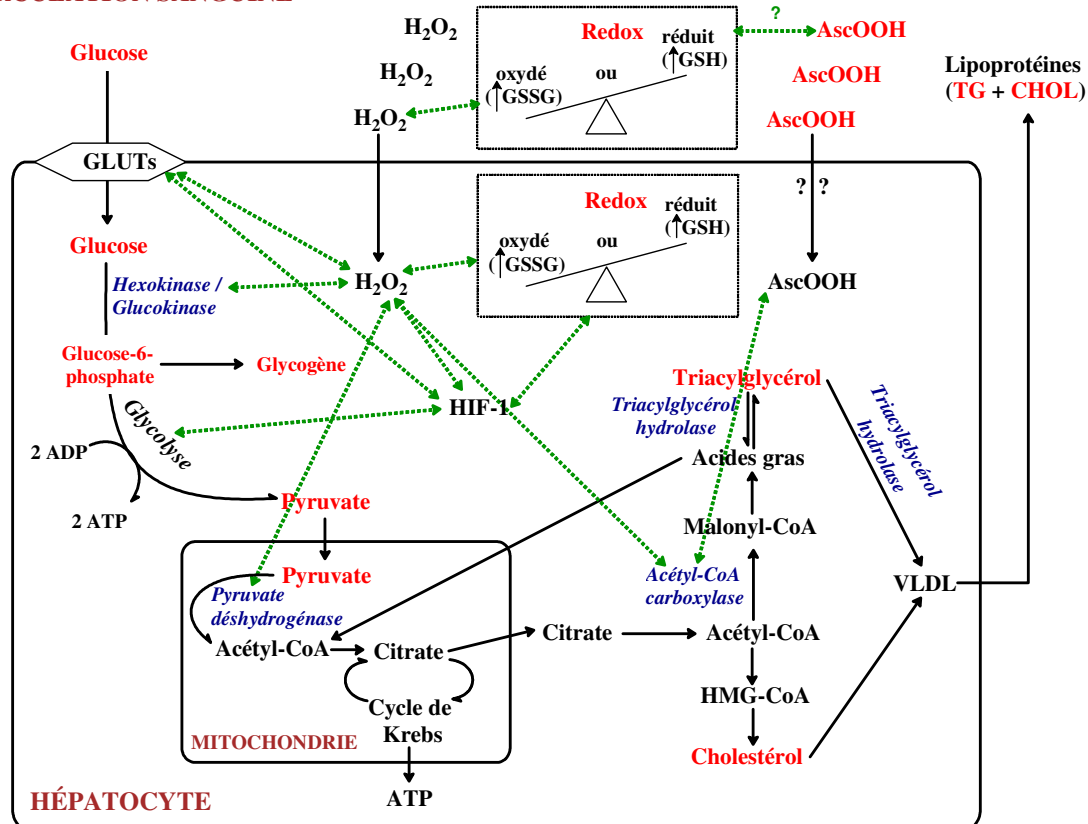


FIGURE 15. Schéma simplifié du métabolisme énergétique hépatique étudié. En rouge, les paramètres mesurés au laboratoire dans le cadre de mon projet dans le modèle animal. En vert, les interactions. En bleu, les enzymes [149, 150].

1.5. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

1.5.1. Principes

La chromatographie liquide (LC) est une séparation physique des analytes d'un échantillon qui se base sur leur différence de coefficients de distribution entre deux phases non miscibles. Une phase mobile est poussée à haute pression à travers une phase stationnaire. L'échantillon est injecté dans la phase mobile, et une série d'adsorptions et de désorptions sur la phase stationnaire – la colonne analytique – permet la séparation. Un détecteur mesure un paramètre physique sur l'éluat [163]. Dans notre cas, c'est le spectromètre de masse. Pour l'analyse de composés neutres, polaires ou ioniques, la chromatographie en phase inverse (RP-HPLC) est couramment employée. La phase stationnaire y est non polaire et consiste souvent en une colonne remplie de silice unie à de longues chaînes alkyles (C18, p.ex.). La phase mobile est polaire et composée d'un mélange de solutions aqueuse et organique. L'utilisation d'un tampon permet de contrôler le pH et ainsi la protolyse des composés ionogéniques. Ceci améliore la rétention des analytes, ainsi que la sélectivité et la résolution de la chromatographie [163]. Un bon choix de tampon général est l'acétate d'ammonium à cause de sa stabilité chimique, son caractère presque neutre dans l'eau, sa solubilité dans l'acétonitrile et le méthanol, sa relative volatilité, sa non-toxicité, etc. [164]

La spectrométrie de masse (MS) consiste à produire des ions en phase gazeuse à partir des composés en solution dans l'éluat de la chromatographie, à filtrer ces composés selon leur ratio de masse sur charge (m/z) et à les détecter pour donner un spectre de leur abondance relative [163]. C'est une technique spécifique qui permet de suivre des ions de masse distincte [165]. Le spectromètre de masse se compose de cinq parties : l'injecteur, la source de production d'ions, un ou plusieurs analyseurs, le détecteur d'ions, et l'ordinateur qui compile les données. Il existe plusieurs méthodes pour ioniser les composés, qui sont dites soit douces ou dures. Celle utilisée dans notre cas en est une douce, l'électrospray (ESI), et consiste à appliquer un champ électrique à pression atmosphérique à l'éluat qui arrive par un capillaire. La nébulisation est assistée d'un puissant jet d'azote chaud. Des gouttelettes chargées de quelques micromètres sont générées. Les gouttelettes se divisent, le solvant s'évapore et des forces coulombiques les obligent à se repousser et à

s'individualiser [163, 166]. La complexité de la matrice ou la coélution peuvent cependant générer de la suppression ionique qui est un problème commun en spectrométrie de masse. En effet, la présence de molécules moins volatiles à la source modifie l'efficacité de la formation et de l'évaporation des gouttelettes, et affecte la génération d'ions [165]. L'ionisation peut aussi provoquer la dimérisation de composés [167]. En outre, il existe également plusieurs types d'analyseur. Le nôtre est un quadripôle simple qui se compose de quatre tiges cylindriques placées parallèlement, dont deux sont chargées par un courant continu (DC), et les deux autres génèrent un courant alternatif oscillant (RF). Les ions sont introduits au centre du quadripôle, où un vide est créé, et une combinaison de courant DC et RF permet de laisser passer une seule valeur de m/z à la fois jusqu'au détecteur [163]. Plusieurs analyseurs de type quadripôle peuvent être couplés successivement pour faire de la spectrométrie de masse en tandem : il y a sélection d'un ion par une première spectrométrie de masse, fragmentation, suivi d'une deuxième spectrométrie de masse sur les fragments générés [166]. Notre appareil n'a toutefois pas cette capacité.

Pour la quantification des analytes, il est possible d'utiliser des étalons externe ou interne. La première consiste à préparer un échantillon factice avec une quantité connue en analyte et à l'analyser séparément de notre échantillon expérimental. En utilisant les mêmes volumes, on peut comparer l'intensité des réponses et faire une règle de trois. Une courbe de calibration avec des quantités croissantes est nécessaire pour vérifier au préalable que la réponse, et l'ionisation, sont linéaires. Pour réduire les erreurs de manipulation liées à la méthode de l'étalon externe, l'erreur liée à chaque mesure au MS, et l'effet de la matrice sur l'analyse, l'utilisation de la méthode d'étalon interne est plus appropriée. Cela consiste à ajouter une quantité connue d'une molécule proche chimiquement et physiquement de l'analyte le plus tôt possible dans le traitement de l'échantillon. Au lieu de comparer des abondances, on fait un ratio de signaux. Leur ratio étant resté constant durant les manipulations et la mesure. Ici aussi, une courbe de calibration est nécessaire en préliminaire : on ajoute des quantités croissantes d'étalon à des solutions de l'analyte dont la quantité connue reste constante, et la relation mathématique donne un rapport de réponses au détecteur [166]. L'étalon interne peut être soit un analogue structural marqué avec un isotope stable, soit un analogue structural non marqué, ou alors un composé de la même famille chimique que l'analyte. Le premier donnent généralement de meilleurs résultats, mais n'étant pas toujours disponibles,

l'analogue structural non marqué peut être utilisé en considérant les différences avec l'analyte [166, 168].

1.5.2. Utilisation pour la vitamine C et ses dérivés

Le LC-MS est tout indiqué pour l'analyse de la vitamine C et de ses produits de dégradation, tel que démontré par les précédents papiers du laboratoire [53, 169]. La pertinence de la technique est également confirmée par le fait que d'autres équipes l'ont également utilisé, en mode négatif, pour l'analyse de la vitamine C et ses dérivés. Par exemple, Deutsch détectait, à pH neutre, le DKG et sa forme hydratée à m/z 191 et 209, le thréonate à m/z 135, et un intermédiaire entre DKG et thréonate à m/z 163 [167]. Il utilisait, comme nous, l'électrospray et le quadripôle comme source d'ionisation et mode d'analyse. Cioffi *et al.*, en 2000, employèrent aussi le LC-MS avec électrospray pour étudier l'hydrolyse du DHA à pH neutre [81]. Ils détectaient aussi le DKG hydraté à m/z 209, ainsi que le DHA déshydraté à m/z 173, le DHA hydraté à m/z 191, et un adduit acétate-DHA à m/z 233. Enfin, Frenich *et al.* utilisèrent aussi le LC-MS avec l'électrospray à un voltage de 20V et simple quadripôle pour quantifier l'acide ascorbique dans des échantillons alimentaires. Ils détectaient l'AsCH⁻ à m/z 175 et son fragment caractéristique à m/z 115 [170].

2. Hypothèses et objectifs

2.1. Hypothèse

Notre hypothèse est que l'infusion d'AscOOH modifie le statut redox sanguin et/ou tissulaire, ce qui engendre conséquemment certains des effets biologiques observés dans notre modèle animal telles des modifications du métabolisme lipidique [4]. Notre hypothèse est d'autant plus importante à vérifier qu'elle implique des considérations cliniques à ne pas oublier :

- l'incidence de la prématurité et d'un faible poids à la naissance est en croissance [171];
- les jeunes patients touchés sont nourris par HAIV (section 1.1.1, p.2);
- l'infusion des solutions d'HAIV (contenant des multivitamines) sans une adéquate protection contre la lumière ambiante est associée à une incidence plus élevée de complications pathologiques fréquemment rencontrées chez l'enfant prématuré (i.e. cholestase et de dysplasie broncho-pulmonaire, section 1.1.3, p.8);
- des molécules oxydantes et de l'AscOOH sont générés dans l'HAIV par interaction entre l'ascorbate, la riboflavine, l'oxygène dissous et la lumière (section 1.2.3.3, p.21);
- l'enfant prématuré est particulièrement vulnérable face aux espèces oxydantes par une immaturité de ses défenses antioxydantes (section 1.3.2, p.33).

2.2. Objectifs

2.2.1. Objectif principal

Dans notre modèle animal de cochon d'Inde, nous avons pour objectif de documenter l'effet dose-réponse d'une infusion d'AscOOH sur les paramètres redox et métaboliques au niveau sanguin, hépatique et pulmonaire (Voir la Figure 15, p.36).

2.2.2. Objectifs secondaires

Pour se faire, il fallait :

1. développer une méthode **fonctionnelle** – spécifique et sensible – de dosage quantitatif de l'AscOOH produit *in vitro* (HAIV) et *in vivo* (urines, plasma, foie), par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide, en utilisant une molécule d'étalon interne adéquat;
2. la démonstration, à l'aide du modèle de cobayes bien établi au laboratoire d'accueil, de relations entre la concentration tissulaire en AscOOH et
 - la lipidémie (TG et cholestérol (CHOL))
 - la glycémie
 - des métabolites de la glycolyse et de la lipogenèse hépatiques (glucose, G6P, glycogène, pyruvate, lactate, TG, CHOL)
 - le statut redox érythrocytaire, plasmatique, hépatique et pulmonaire
 - l'alvéolarisation pulmonaire;
3. la confirmation d'un effet de l'AscOOH dans un modèle cellulaire.

3. Matériel et méthodes

3.1. Matériel

J'ai dressé ici la liste des produits et appareils utilisés dans le cadre de mon projet, classés selon le fabricant.

Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada : Système HPLC/MSD Série HP 1100, colonne chromatographique ZORBAX Eclipse XDB C18 4,6 × 30mm 1,8µm, fioles à LC-MS vissables, bouchons à fioles, inserts à fioles;

Aldrich Chemicals, Milwaukee, WIS, USA : diméthylsulfoxyde (DMSO), chlorure ferreux tétrahydraté (FeCl₂•4H₂O), sulfate ferreux heptahydraté (FeSO₄•7H₂O), acide L-2-oxothiazolidine 4-carboxylique (OTC), chlorure de potassium (KCl), tungstate de sodium dihydraté, chlorure de sodium (NaCl), sel de calcium de l'acide L-thréonique, 2-vinylpyridine, o-cresilsulfonphthalein-3',3''-bis-(méthyliminodiacétate de sodium) (xylénol orange);

Anala R BDH Laboratory Suppliers, Poole, Angleterre : chlorure de magnésium (MgCl₂);

American Chemicals, Montréal, QC, Canada : hydroxyde de sodium (NaOH), acétate de potassium;

J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA : hydroxyde de potassium (KOH).

Baxter, Mississauga, ON, Canada : acides aminés Travasol® 10%;

Bayer, Toronto, ON, Canada : Xylazine;

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

Biospec Products, Bartlesville, OK, USA : homogénéisateur Polytron (Tissue-Tearor);

BDH, Toronto, ON, Canada : acide picrique,

BD, Oakville, ON, Canada : tubes pour prélèvements sanguins (Vacutainer® spray-coated K₂EDTA Tubes);

BioRad, Mississauga, ON, Canada : dosage protéique BioRad, bloc d'alimentation électrique (Model 1000/500 Power Supply);

BioVision, Mountain View, CA, USA : kit de dosage du pyruvate (Pyruvate Assay Kit (K609-100));

Boehringer Mannheim GmbH, Laval, QC, Canada : acide acétique tétra-éthylènedinitrilo disodique (EDTA-Na₂), Tris (hydroxyméthyl) aminométhane (TRIS base), TRIS hydrochlorure (TRIS HCl), albumine de sérum bovin (BSA), Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES), pyruvate, ;

Charles River St-Constant, Montréal, QC, Canada : cochons d'Inde;

EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, USA : bandes indicatrices de pH colorphast (pH 0-14)

Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA : 2(bis(2-hydroxyéthyl)imino)-2-(hydroxyméthyl)-1,3 propanediol (Bis-TRIS), phosphate de sodium monobasique ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), eau H_2O HPLC grade, acétate d'éthyle, acide sulfurique (H_2SO_4), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), acide formique, acide métaphosphorique (MPA), métabisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), pyrophosphate de sodium ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10(\text{H}_2\text{O})$);

ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA : bleu de trypan;

Invitrogen, Grand Island, NY, USA : milieu minimum essentiel GIBCO (MEM), Milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium low glucose GIBCO (DMEM), Trypsine-EDTA 0,05% GIBCO, pénicilline-streptomycine (10 000 unités/ml et 10 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) GIBCO, acides aminés non essentiels 100X GIBCO, supplément GlutaMAX;

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

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

Millipore, Billerica, MA, USA : dispositif de filtration par centrifugation Centricon® Plus-20 Ultracel PL-30K Membrane, unités de filtration pour seringue Millex-HN 0,45 μm ;

MP Biomedicals, Solon, OH, USA : Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase (GAPDH), acide trichloroacétique (TCA);

Pharmacia Upjohn, Baie D'Urfé, QC, Canada : Intralipid® 20 %;

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

Roche Diagnostique, Montréal, QC, Canada : glutathion réduit (GSH), glutathion oxydé (GSSG), glutathion réductase (GR), nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), kit de quantification des triglycérides, kit de quantification du cholestérol, standard de glycérol precimat, standard de cholesterol CFAS;

Sabex, Boucherville, QC, Canada : multivitamines multi-12® pédiatrique, Kétamine;

Sarstedt, Montréal, QC, Canada : tubes à centrifuger de 50 ml;

Sigma-Aldrich Co, St-Louis, MO, USA : acide L-ascorbique, acétonitrile HPLC grade, acétate d'ammonium HPLC grade, acide métaphosphorique (MPA), borate de sodium, acide sulfosalicylique (ASS), L-sérine, phosphate de sodium dibasique (Na_2HPO_4), acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) (DTNB), méta-bisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), chlorure de calcium ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), chlorure ferreux (FeCl_2), hydroxytoluène butylé (2,6-di-ter-butyl-4-methylphenol) (BHT), tert-butyl hydroperoxyde (TBH), créatinine, catalase, cholestérol, dimère d'acide déhydro-L-ascorbique (DHA), 2-déoxy-D-glucose, alcool éthylique HPLC grade, L-glutamine, D-glucose-6-phosphate, α -D-glucose, acide éthylène-diamine-tétraacétique tripotassium (K_3 -EDTA), L-lactate déshydrogénase (LDH), déshydrogénase malique, β -nicotinamide adénine dinucléotide forme réduite (β -NADH), phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4), phlorétine, riboflavine, triéthanolamine, triphénylphosphine, 2-dodecoxyethanol (Thesit);

Whatman, Florham Park, NJ, USA : papiers filtres qualitatifs ronds (4,25cm) de qualité 1 et 3.

3.2. Mise au point du dosage de l'ascorbylperoxyde

3.2.1. Génération d'ascorbylperoxyde *in vitro*

Le système générateur d'AscOOH utilisé consiste en une solution contenant de l'acide ascorbique (AscH₂), de la riboflavine (Rf), du H₂O₂ et de l'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH 10% (v/v) (ou 2,51M)). Il se base sur le modèle chimique de photo-oxydation présenté précédemment à la page 21. J'ai repris et standardisé le système générateur développé et utilisé par Knafo et décrit dans son article et mémoire [4, 169].

La recette originale consiste en 1,8mM d'AscH₂, 30μM de Rf, 400μM de H₂O₂, et 1,89mM de NH₄OH. Ceci correspond aux concentrations d'AscH₂ et de Rf retrouvées dans l'HAIV contenant 2% de multivitamines multi-12® (2% équiv. MV). J'exprimerai souvent les concentrations de systèmes générateurs en « équivalent MV ». Selon Knafo, le H₂O₂ est facultatif, mais permet d'accélérer la réaction.

L'hydroxyde d'ammonium permet de neutraliser le pH de la solution initialement autour de 4-5. Lors de la préparation de systèmes générateurs, le pH était ajusté en calculant d'abord précisément le pH produit par la solubilisation de l'AscH₂, un acide faible de pK_a = 4,18. La constante de dissociation d'un acide faible ($K_a = \frac{[H^+]^2}{[Acide]_{initiale} - [H^+]}$) permet la détermination des protons libérés en isolant [H⁺] de l'équation quadratique selon la formule : $[H^+] = \frac{-K_a + \sqrt{K_a^2 + 4 \times K_a \times [Acide]_{initiale}}}{2}$. Puis, je calculais la concentration nécessaire en NH₄OH 10% (pK_b = 1,8 X 10⁻⁵) pour neutraliser les protons de façon à obtenir un pH le plus près possible de 7,5.

Habituellement, le système est préparé à raison d'une vingtaine de millilitres au plus dans un tube de 50mL en polypropylène. L'oxygène dissous est nécessaire à la réaction, il vaut donc mieux laisser un espace d'air résiduel dans le tube.

Puis, on expose la solution à la lumière ambiante, qui est d'environ 810 lux. La photoexposition permet la réaction photochimique, comme il fut démontré précédemment (page 21). La durée permet de contrôler la complétion de la réaction, mais cette dernière dépend de plusieurs facteurs qui ont été testés dans le cadre de mon projet : la distance d'une source lumineuse (5, 15, 25, 35 cm d'un fluorescent dans une chambre noire et le témoin - lumière), la concentration du système générateur (5 et 24% équiv. MV), le rapport

surface/volume (0,72 ; 0,36 ; 0,24) nécessaire à l'oxygénation de la solution, ainsi que l'ajout d'un agitateur magnétique. Le pH optimal (2 ; 7 ; 12, ajusté respectivement avec HCl, acétate d'ammonium ou NaOH) pour la réaction a aussi été étudié, ainsi que le ratio Rf/AscH⁻ (0 ; 3 ; 30 ; 100 ou 300µM de Rf pour 1,8mM d'AscH⁻).

Dans le cadre de l'incubation de modèles cellulaires ou de l'infusion d'animaux avec des systèmes générateurs, il faut pouvoir distinguer l'effet spécifique de l'AscOOH de celui du H₂O₂ contaminant les solutions. L'élimination du H₂O₂ se fait en traitant les solutions avec un excès de catalase (concentration finale ≥ 100U/ml), puis en les filtrant par centrifugation avec des dispositifs *Centricon*® pour enlever l'enzyme. Le filtre laisse passer ce qui est <30kDa, alors que la catalase a un poids moléculaire de ~250kDa.

3.2.2. Spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (LC-MS)

C'est dans le but précis de quantifier l'AscOOH issu de mes expériences *in vitro* et *in vivo* que cette technique de chimie analytique fut utilisée. Ici encore, j'ai poursuivi les travaux de Knafo dont la méthode au LC-MS comportait une injection directe, sans chromatographie, des solutions et urines à analyser [4]. Les paramètres du spectromètre de masse avaient été passablement bien déterminés, j'ai donc repris là où mon prédécesseur avait arrêté en développant la chromatographie permettant de séparer et donc de mieux identifier et quantifier l'AscOOH dans des échantillons biologiques complexes.

3.2.2.1. Méthode de spectrométrie de masse

Initialement, le voltage d'ionisation (ou de fragmentation) au MS était fixé à 70V. La molécule 136 était majoritairement retrouvée dans les systèmes générateurs [4]. Or, le voltage de la source détermine la fragmentation des molécules ionisée. Comme il a été montré que la molécule 136 était la fille de la molécule 208, j'ai voulu vérifier l'effet du voltage (20 – 110V) sur la fragmentation de ces produits de dégradation de la vitamine C. En effet, la fragmentation détermine les ratios d'abondance en molécule mère versus fille et influence ainsi la quantification.

Considérant que l'on travaillait en mode négatif au MS, il fallait vérifier si la partie aqueuse de la phase mobile devait être de l'eau ou un tampon afin conserver un pH favorable à l'anionisation des analytes. L'acétate d'ammonium (10 et 33mM) a été testé.

En outre, les coefficients de variation intra- et inter-essai ont été déterminés. Pour la variation intra, un système générateur 2% équiv. MV fut analysé n=9 fois de suite lors de la même journée. Des urines de cochons d'Inde décongelées et mélangées ont aussi servi à établir la variation intra- et inter-analyse dans l'urine. Cette mixtion d'urines fut passée n=9 fois au LC-MS lors de la même journée pour la variation intra; puis 2 autres jours (n=3) pour la variation inter-essai. La méthode du standard interne permet de normaliser ces variations.

En outre, le seuil de détection a été estimé en faisant un intervalle de confiance à 95% autour de l'ordonnée à l'origine prédite par une courbe de calibration du système générateur. La courbe de calibration utilisée provient en fait de n=3 courbes, analysées lors de jours différents. Elle contient 15 points répartis autour de l'ordre de concentration attendu du seuil de détection [172]. Une régression linéaire est d'abord établie entre les concentrations en AscOOH équivalentes au standard (y) et les abondances absolues d'AscOOH brutes données au LC-MS (x). Une ordonnée à l'origine est obtenue en concentration, et on obtient le seuil estimé en concentration via un intervalle de confiance calculé par le logiciel statistique R. Il est à noter que plusieurs méthodes existent pour déterminer ce seuil, mais qu'aucun consensus n'existe parmi la communauté scientifique [172]. La méthode utilisée est appuyée par la théorie statistique.

Il est à noter que deux modes d'acquisition sont possibles au MS : le scan qui balaie toutes les valeurs de m/z dans un intervalle de masses défini, détectant tout ce qui s'ionise dans l'échantillon, et la détection de m/z précises (SIM pour « Selected Ions Monitoring »). Ce choix s'effectue selon les besoins et sera spécifié pour chaque expérience décrite. Lorsque la quantification est nécessaire, le mode SIM est utilisé car il est plus spécifique et plus sensible [166].

3.2.2.2. Méthode chromatographique

Dans le but d'optimiser la séparation des produits de la vitamine C suivies au MS, il fallait d'abord s'assurer que la combinaison de phases mobiles aqueuse et organique était compatible avec la chromatographie. Pour la phase organique, l'acétonitrile a été choisi car c'était le solvant utilisé dans la méthode développée par Knafo, donc compatible avec nos analyses [4]. Pour la phase aqueuse, l'utilisation du tampon d'acétate d'ammonium fut éprouvée qualitativement par l'observation des chromatogrammes obtenus.

Au niveau du type de colonne, celle utilisée fut une C18 XDB de marque ZORBAX Eclipse. C'est une colonne versatile à durée de vie prolongée, qui s'utilise à des pH de 2 à 9 et qui donne des pics symétriques pour des composés acides, neutres et basiques.

Puis, différents programmes de chromatographie (ratios isocratiques et gradients d'élution) furent testés, ainsi que différents débits (0,2 à 1ml/min).

Pour l'identification des pics et une meilleure caractérisation des chromatogrammes des échantillons obtenus *in vitro* ou *in vivo*, des échantillons purs d'AscH⁻, de DKG, de DHA et de thréonate (5mM) ont été analysés sur le LC-MS en mode scan. Puis, des systèmes générateurs et des échantillons d'urine furent enrichis par des hautes concentrations d'AscH⁻, de DKG, de DHA et de thréonate exogènes. L'urine fut également enrichie par une quantité croissante d'un système générateur (concentration finale de 0 – 20% équiv. MV).

3.2.2.3. Traitement des échantillons

Les solutions de système générateur, étant donné la relative simplicité de leur matrice, n'étaient pas traitées avant injection sur le LC-MS. J'ai tout de même testé l'effet de la filtration de ces systèmes générateurs par des unités de filtration pour seringue de 0,45µm sur le dosage d'AscOOH.

Les échantillons biologiques provenant de notre modèle animal qui sont analysés par LC-MS, i.e. les urines principalement, présentent une matrice complexe. Initialement, l'urine était déprotéinisée à l'acide trichloracétique 10%, mais l'acide interférait avec le dosage en nuisant à l'ionisation. L'ajout d'un volume d'acétonitrile (ACN) fut utilisé en remplacement, mais cette méthode diluait excessivement certains échantillons. Par défaut, les urines ont donc été centrifugées 5 minutes à 7 200g à température pièce. L'effet de la précipitation préalable des protéines à l'acide formique (concentration finale de 0,1% v/v) sur la détection de l'AscOOH a toutefois été testé. Aussi, la formation d'AscOOH urinaire post-excrétion à partir de la vitamine C endogène a été caractérisé en ajoutant de l'AscH⁻ (1mM) à de l'urine. Cette détermination est pertinente pour ne pas surévaluer l'AscOOH urinaire analysé dans nos échantillons expérimentaux.

Puisque le dosage pourrait être utilisé en néonatalogie, il était pertinent de vérifier la faisabilité de doser l'AscOOH dans des urines récoltées sur papier buvard et éluées, en rapportant les valeurs par unité de créatinine, qui est aussi éluée [173]. Quatre solutions expérimentales ont été préparées dans une matrice d'urine pour évaluer la validité et la

stabilité d'une telle méthode : ❶ concentration élevée en créatinine (250mg/dL) et élevée en AscOOH (750µM); ❷ concentration élevée en créatinine (250mg/dL) et basse en AscOOH (25µM); ❸ concentration basse en créatinine (30mg/dL) et élevée en AscOOH (750µM); ❹ concentration basse en créatinine (30mg/dL) et basse en AscOOH (25µM). Ces solutions étaient analysées par LC-MS pour l'AscOOH et la créatinine était également mesurée. Trois cents µL de chaque solution étaient aussi déposés sur un papier filtre rond Whatman #1 de 4,25cm, puis séchés à l'air, protégé de la lumière. L'éluat se faisait en imbibant 500µL d'eau nano pure sur le papier et en le centrifugeant 10 minutes dans un entonnoir artisanal inséré dans un tube de 50mL. L'éluat était analysé par LC-MS pour l'AscOOH et la créatinine était aussi mesurée, afin de comparer les résultats pré- et post-buvard.

3.2.2.4. Quantification (molécule étalon)

Étant donné que l'AscOOH est une molécule nouvellement décrite, elle n'est pas encore disponible de façon commerciale et encore moins en version deutérée. Le choix d'utiliser un analogue structural comme étalon interne était inévitable.

Nous avons d'abord voulu tester la détection et la quantification du glucose par le LC-MS, une molécule cyclique de masse moléculaire de 180,2g/mol, donc proche de l'AscH⁻ et de l'AscOOH. Il était rapporté dans la littérature que cette molécule était utilisable dans des conditions similaires aux nôtres [174].

Puis, il fut question de l'acide L-2-oxothiazolidine 4-carboxylique (OTC), une prodrogue de la cystéine, et analogue de la 5-oxoprolinone. Cette molécule exogène est un substrat pour la 5-oxoprolinase qui peut convertir l'OTC en cystéine [175]. L'OTC est une molécule cyclique de masse moléculaire de 147g/mol qui contient une fonction acide carboxylique. Sa constante de dissociation est de 3,32 [176]. L'OTC est donc majoritairement retrouvé sous forme anionique déprotoné à pH neutre.

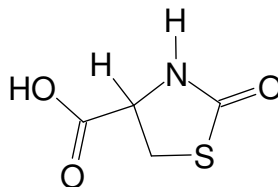


FIGURE 16. Structure de l'OTC [176].

Les courbes de calibration externe (0 – 1mM) et interne (125µM) de la molécule étalon choisie ont été effectuées. La courbe de calibration externe permet de constater si la détection du standard est linéaire et stable. La courbe interne permet de vérifier l'interaction du standard avec les analytes en faisant un graphique du ratio des réponses (analyte/étalon), en fonction du ratio des concentrations (système générateur (0 – 2% équiv. MV)/étalon ou urine/étalon). Une courbe d'enrichissement (0 – 5mM d'étalon) a aussi été accomplie dans trois urines différentes. En outre, l'effet du pH de la matrice (2,5 – 9) sur la détection du standard a aussi été expérimenté. La stabilité de la solution stock a aussi été testée dans le temps.

3.2.3. Stabilité et caractérisation de l'AscOOH

En utilisant la méthode de quantification mise au point en LC-MS, plusieurs expériences ont permis de caractériser la stabilité de l'AscOOH. La stabilité à moyen terme (0 – 167d) de l'AscOOH provenant d'un système générateur 2% équiv. MV conservé à -80°C fut déterminée.

En parallèle à mes objectifs, comme j'avais un doute sur la structure proposée de l'AscOOH, j'ai voulu la confirmer par quelques expériences. Ainsi, des systèmes générateurs préalablement exposés ont été incubés avec du métabisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) ou du borhydrure de sodium deutéré ou non ($\text{NaBD}_4/\text{NaBH}_4$). Le métabisulfite devient bisulfite en solution (HSO_3^- , masse moléculaire de 81g/mol), et ce dernier peut s'ajouter sur les fonctions aldéhydes et cétones [177] ou réduire les hydroperoxydes [114]. Quant au borhydrure de sodium, il réduit les hydroperoxydes, les cétones et les aldéhydes en groupes hydroxyles [178]. Du $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ a été ajouté de façon croissante (0 – 9mM) à un système générateur 2% équiv. MV déjà exposé. Les échantillons ont été analysés par LC-MS en scan. Quant au $\text{NaBH}_4/\text{NaBD}_4$, un excès (37 fois) a été ajouté à 500µL de système générateur 80% équiv. MV en milieu basique (NaOH, pH~10), puis réacidifié avec 10µL d'acide formique. Les échantillons ont été analysés par le LC-MS en scan pour constater des différences dans les spectres de masses.

Puis, pour tenter de démontrer la fonction peroxyde, deux protocoles ont été pensés. Le premier consistait à utiliser la triphénylphosphine (TPP), qui réduit spécifiquement les fonctions hydroperoxydes en leur alcool correspondant [179, 180]. Neuf cents µl d'un système générateur 1% équiv. MV exposé ont été incubés avec : 100µL de TPP 50mM

solubilisé dans le méthanol, ou 100µL de méthanol. Les concentrations d'AscOOH ont été comparées. De plus, un test de conjugaison de l'AscOOH avec le glutathion par la glutathion-S-transférase (GST) a été effectué. Un système générateur 2% équiv. MV a été utilisé pour solubiliser du GSH et obtenir une concentration de 10mM en GSH. Cinq µL de la solution enzymatique de GST (1U/mL) furent ajoutés à 1mL du mélange systèmes générateur-GSH. Une incubation de 35 minutes sous vortex faible a suivi. Les échantillons ont été analysés sur LC-MS à la recherche de nouveaux pics correspondants à l'adduit GS-AscOOH.

3.3. Protocoles expérimentaux *in vivo*

3.3.1. Quantification de l'ascorbylperoxyde dans l'urine d'enfants nés prématurément sous HAIV ± lumière

Afin de vérifier si l'AscOOH généré dans l'HAIV infusée aux enfants se retrouvait dans leurs urines, j'y ai dosé l'AscOOH. Il est à noter que ceci était un préliminaire et qu'à ce moment, la méthode de dosage au LC-MS était encore en développement.

Les urines d'enfants nés prématurément (n=12) provenaient du B.C.'s Children's Hospital (Vancouver), dans le cadre d'une collaboration dans une étude approuvée par les comités d'éthiques applicables. Les bébés avaient reçu une HAIV courante (contenant 1% MV) protégée ou non de la lumière. Les urines furent récoltées après 3 – 4 jours sous HAIV et congelées à -80°C pour être expédiées sur glace sèche. Les urines étaient décongelées sur glace et déprotéinisées par l'ajout d'un volume d'acétonitrile (ACN), puis centrifugées à 4°C durant 5 minutes à 7 200g. L'AscOOH fut dosé par LC-MS en utilisant un étalon externe, l'OTC, étant donné que la méthode de l'étalon interne n'était pas encore à point à ce moment. Les résultats ont été rapportés à la quantité de créatinine.

3.3.2. Modèle animal

Le choix du modèle animal était simple : le cobaye (*Cavia porcellus*) néonatal de trois jours de vie. C'est le modèle néonatal utilisé pour tester les infusions d'HAIV par le laboratoire d'accueil qui est éprouvé depuis des années et dont l'usage a passé maintes fois la révision par les pairs [4, 23, 35, 37, 42, 43, 181-183]. Le choix du modèle s'explique par des raisons scientifiques et techniques.

En effet, cet animal est idéal pour étudier l'effet d'infusions de vitamine C et ses dérivés puisque, à l'instar de l'être humain, il ne synthétise pas l'AscH₂ de façon endogène [184]. Du point de vue développemental, le cobaye présente une gestation longue avec la naissance de quelques petits développés, dits précociaux. Ceci contraste avec les modèles de rongeurs dont la durée de gestation est courte et mène à la naissance de nombreux petits immatures, i.e. altriciaux [185]. De fait, le cochon d'Inde n'est pas un rongeur [186]. Plusieurs étapes du développement fœtal humain sont aussi retrouvées chez le cochon d'Inde [184]. Par exemple, la croissance rapide associée au troisième trimestre de gestation. De la même façon, le profil développemental des antioxydants enzymatiques et du système glutathion se ressemblent, et tous deux sont immatures à la naissance, à la fois chez l'humain et le cochon d'Inde [187, 188]. En outre, d'un point de vue métabolique, le cobaye présente des similarités évidentes sur le plan du métabolisme hépatique du cholestérol et des lipides : on y retrouve des niveaux plasmatiques supérieurs en LDL qu'en HDL et le cholestérol est transporté par les LDL. De plus, il est rapporté que les cobayes répondent de façon semblable à l'humain quant aux traitements par certains médicaments, aux déficiences en acide ascorbique, au stress oxydant, ainsi qu'à la régulation des lipoprotéines en réponse à l'alimentation [184, 189].

Enfin, du point de vue technique, même si notre modèle prématuré est un animal né à terme, certaines contraintes physiques empêchent l'utilisation de cobayes à des âges pré- ou postnataux plus bas. En effet, l'expérience au laboratoire a montré que le cochon d'Inde de trois jours de vie a juste la taille limite nécessaire à la pose d'un cathéter dans la veine jugulaire. De plus, ils sont sevrables à seulement 2 jours de vie [184]. Finalement, c'est un animal plutôt inoffensif et même très craintif. Ces raisons permettent d'appuyer notre choix de modèle idéal, par rapport à d'autres, pour les études du laboratoire.

Le lundi, les animaux sont d'abord anesthésiés à la kétamine (50mg/mL; 0,18mL/100g) – xylazine (20mg/mL; 0,05mL/100g) afin de pouvoir leur introduire un cathéter de polyuréthane de 0,4mm dans la veine jugulaire externe. Le cathéter s'extériorise dans la région scapulaire. Il est connecté à une seringue contenant l'HAIV expérimentale qui la délivre graduellement par l'action d'un pousse-seringue automatique. Le montage permet aux animaux de bouger. Ces derniers sont nourris exclusivement de façon intraveineuse. La température ambiante est contrôlée et le cycle circadien est divisé moitié-moitié de lumière-noirceur. Au 4^e jour de traitement, sous anesthésie, organes et

tissus sont prélevés et l'animal meurt par exsanguination. Une partie des tissus (foie, poumon, bile, muscle) est immédiatement congelée à -80°C , l'autre partie subit le traitement suivant.

En moins de 4 minutes, une fraction de sang total (ST), de globules rouges (GR), de poumon (P), et de foie (F) est respectivement ajoutée à 3, 3, 5 et 5 volumes d'acide métaphosphorique (MPA) 5% (p/v). Les échantillons sont vortexés et centrifugés à 7 200g durant 1 minute pour le ST et les GR, ou 3 minutes pour le F et le P. Le surnageant est séparé du culot et les tubes sont immédiatement congelés à -80°C . Le surnageant acidifié sert au dosage du GSH et GSSG et le culot à celui des protéines.

Les études animales ont reçues l'approbation du comité d'éthique animal institutionnel, et sont donc en accord avec le Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA).

3.3.3. Quantification de l'ascorbylperoxyde dans l'urine de cochons d'Inde néonataux sous HAIV \pm lumière

Comme pour les urines d'enfants prématurés, j'ai voulu vérifier si l'AscOOH généré dans l'HAIV infusée à notre modèle animal se retrouvait dans leurs urines. J'y ai donc dosé l'AscOOH, selon la même méthode en développement que celle utilisée pour les bébés (section 3.3.1).

Des urines d'animaux de notre modèle sacrifiés en 2005 ont été conservées au congélateur (-20°C). Ces animaux ($n=38$) avaient reçus par voie intraveineuse – en plus du dextrose 8,7%, NaCl 0,45% et héparine 1U/ml – soit un mélange d'AscH⁻ et de Rf (1,8mM et 30 μ M (équiv. 2% MV)), soit une préparation commerciale de MV 2% (multi-12®). Les solutions d'HAIV étaient exposées à la lumière par défaut. Trois animaux contrôles n'avaient reçus que du dextrose, NaCl et héparine. Les urines étaient décongelées sur glace et déprotéinisées par l'ajout d'un volume d'acétonitrile (ACN), puis centrifugées à 4°C. L'AscOOH fut dosé par LC-MS en utilisant un étalon externe, l'OTC, étant donné que la méthode de l'étalon interne n'était pas encore à point à ce moment. Les résultats ont été rapportés à la créatinine. Les résultats ont été corrélés avec les niveaux de TG hépatiques et plasmatiques mesurés en 2005.

3.3.4. Effet de l'infusion d'AscOOH chez le cochon d'Inde néonatal

Dans le cadre spécifique de mon projet, j'ai voulu vérifier l'effet de l'infusion d'AscOOH sur le statut redox circulant et hépatique, ainsi que sur le métabolisme hépatique, dans notre modèle animal. Des cochons d'Inde (n=11) de 3 jours de vie ont reçu par voie intraveineuse durant 4 jours, en continu, une solution contenant de l'AscOOH entre 0 et 3,3mM (via des systèmes générateurs de 0 – 8% équiv. MV préalablement exposés), du dextrose (8,7% p/v), du NaCl (0,35% p/v), et de l'héparine (1U/mL). Tel que décrit précédemment, les animaux ont été sacrifiés au 4^e jour de traitement pour le prélèvement des tissus. Les concentrations tissulaire (sang, érythrocytes, foie, poumon) et urinaire en AscOOH ont été analysées par LC-MS, avec l'utilisation de la méthode de l'étalon interne développée. L'AscOOH urinaire est rapportée à la créatinine. À des fins de corrélations avec l'AscOOH, les TG et le CHOL plasmatiques et hépatiques ont été mesurés, ainsi que le GSH et GSSG du sang total, des globules rouges, du foie et du poumon. Au niveau hépatique, le lactate, le pyruvate, le glucose et le G6P furent dosés. Parce que l'incidence de dysplasie broncho-pulmonaire est très élevée chez l'enfant né prématurément sous HAIV, par curiosité, l'alvéolarisation pulmonaire fut aussi déterminée après fixation sur lame.

3.4. Protocoles expérimentaux *in vitro*

3.4.1. Effet de l'incubation d'AscOOH sur la concentration en glutathion et l'entrée d'AscOOH dans des cellules Caco-2

En parallèle, nous avons voulu vérifier certains effets de l'AscOOH en utilisant deux modèles *in vitro* de cellules en culture. Les effets métaboliques potentiels de l'AscOOH nécessitent que celui-ci entre dans la cellule. L'objectif était de vérifier ce fait, et de vérifier si le redox cellulaire était perturbé par l'AscOOH.

D'abord, les cellules Caco-2 sont des cellules épithéliales cancéreuses immortalisées du colon humain. Elles servent de modèle d'absorption par une monocouche cellulaire : elles se différencient en 21 jours sur une membrane semi-perméable de façon à imiter l'épithélium intestinal.

Quatre plaques de six puits avec membranes semi-perméables ont étéensemencées à raison de 1 000 000 cellules/puit. Les cellules baignaient dans un milieu MEM additionné en acides aminés non essentiels (1% v/v), en pénicilline-streptomycine (1% v/v) et en sérum fœtal bovin (5% v/v). Après 21 jours de différenciation, les cellules étaient incubées pendant 24 heures dans une solution de système générateur (concentration finale 0 – 8% équiv MV) diluée dans 1 volume de MEM non supplémenté en sérum. L'AscOOH était mesuré par LC-MS. Après l'incubation, les milieux apicaux et basolatéraux étaient prélevés. Les cellules étaient grattées avec 500µL d'un tampon PBS standard et aliquotées. Certains aliquots ont aussitôt été acidifiés au MPA (concentration finale 1% p/v) afin de doser le GSH et le GSSG cellulaire. Les échantillons ont tous été immédiatement congelés à -80°C pour analyses ultérieures, dont le dosage de l'AscOOH dans les milieux et les cellules.

3.4.2. Effet de l'incubation d'AscOOH sur les transporteurs du glucose dans des cellules HepG2

Les cellules HepG2 sont une lignée cellulaire d'un carcinome hépatique, et se présentent sous la forme d'un épithélium. Ce modèle fut utilisé pour tester une supposition découlant de l'expérience 3.3.4 sur les animaux, selon laquelle l'AscOOH interagit avec l'entrée du glucose dans les hépatocytes.

Le protocole utilisé est celui du transport du 2-déoxyglucose (2-DOG) radioactif, tel que décrit dans le récent article de Ge *et al.* [190]. Brièvement, 100 000 cellules/puit étaientensemencées dans 12 puits de deux plaques à 24 puits. Les cellules étaient gardées deux jours dans un milieu DMEM contenant 1% (v/v) de pénicilline-streptomycine, 5% (v/v) de sérum fœtal bovin et un total de 6mM de glutamine. Un jeun de glucose d'une durée de 30 minutes était effectué avec l'ajout de 700µL d'une solution de système générateur (0 – 80% équiv. MV) dilué 1/20 dans un tampon Krebs-Ringer-Phosphate (KRP : 130mM NaCl ; 5mM KCl ; 1,3mM MgSO₄ ; 1,3mM CaCl₂-2H₂O ; 10mM Na₂HPO₄). L'AscOOH y était mesuré par LC-MS à partir d'un aliquot. À la fin du jeun, 15,02µL de 2-DOG chaud/froid (1µCi/mL et 0,1mM) à 4°C étaient ajoutés dans chaque puit, puis on incubait à 37°C pendant 5 minutes. L'ajout de 1mL de phlorétine 0,3mM stoppait la réaction. Le milieu était jeté et les cellules lysées dans 500µL de SDS 0,1%. 400µL de lysat étaient transférés dans des fioles à scintillation pour l'analyse, et le restant servait au dosage des protéines.

3.4.3. Effet de différents mélanges d'HAIV sur la génération d'AscOOH

Dans les unités de néonatalogie, les nutriments sont administrés en deux solutions, et certains chercheurs prétendent que l'ajout des MV à l'émulsion lipidique, versus à la solution aqueuse contenant acide aminés + dextrose (+ ...), protège les lipides de la peroxydation et les vitamines de la dégradation [26]. J'ai voulu vérifier cette façon de faire sur la génération d'AscOOH. L'effet de l'ajout de la préparation commerciale de MV (multi-12®) à différentes formulation d'HAIV a donc été étudié ± lumière. Ainsi, les MV étaient ajoutées soit à une solution simple de dextrose, ou alors avec les acides aminés ou les lipides d'une HAIV en dérivation (i.e. deux solutés séparés qui se rejoignent au niveau d'un Y près du patient). Les trois mélanges expérimentaux contenaient précisément (voir Figure 17, page suivante) :

1. **MV (1% v/v)** + dextrose (8,7% p/v) + NaCl (0,45% p/v) + héparine (1U/ml);
2. **① MV (1%)** + acides aminés Travasol® (2,01% v/v) + dextrose (8,7%) + héparine (1U/ml) ; en dérivation avec **② Intralipid®** (1,6% v/v) + acides aminés Travasol® (2,01%) + dextrose (8,7%) + héparine (1U/ml).
3. **① acides aminés Travasol®** (2,01%) + dextrose (8,7%) + héparine (1U/ml) ; en dérivation avec **② MV (1%)** + Intralipid® (1,6%) + dextrose (8,7%) + héparine (1U/ml).

Les solutions étaient incubées 3h ± lumière dans une seringue de 10mL, et ensuite analysées par LC-MS individuellement ou mélangées (**① + ②**, lorsqu'applicable) pour la quantification de l'AscOOH généré.

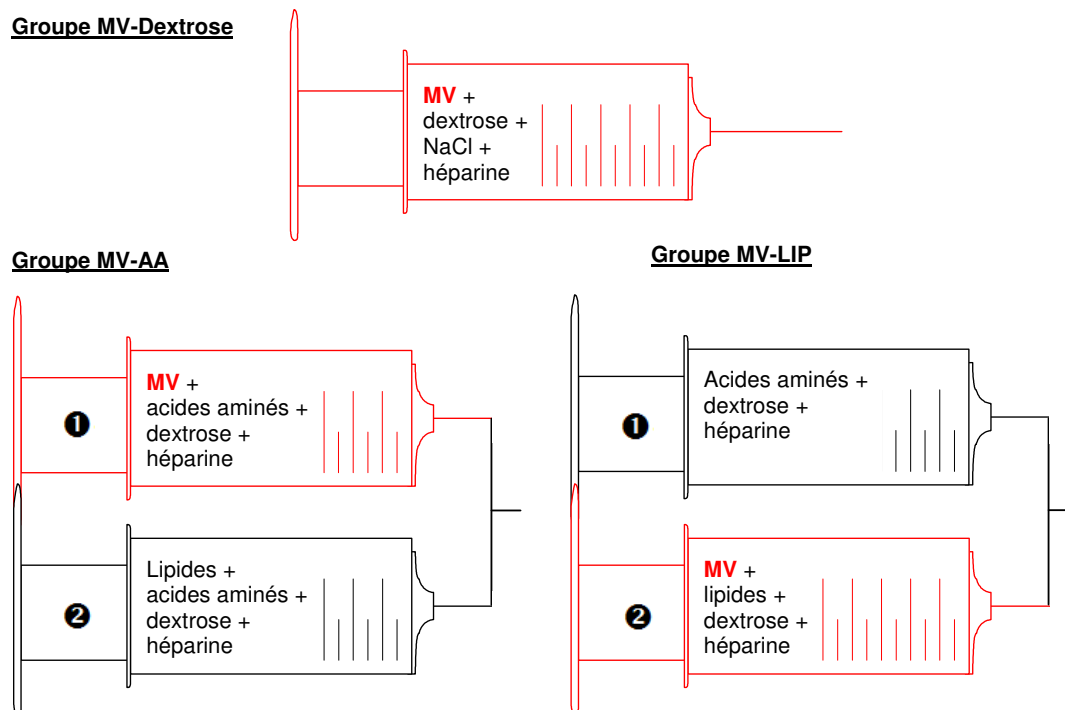


FIGURE 17. Schématisation des solutions expérimentales de l'expérience 3.4.3.

3.5. Dosages biochimiques utilisés

3.5.1. Dosage des peroxydes

Le dosage des hydroperoxydes ($-ROOH$) est effectué par la méthode de l'oxydation du xylénol orange par le fer ferreux (FOX) [114, 179, 191]. En milieu acide, les hydroperoxydes oxydent Fe^{2+} en Fe^{3+} qui peut alors lier le xylénol orange. Le complexe formé absorbe à 560nm [180]. Le réactif FOX utilisé ici est la version solubilisée dans le méthanol.

De façon pratique, 100 μ L d'urine centrifugée ou d'une dilution d'un système générateur sont déposés dans une cuvette spectrophotométrique. 1mL de réactif FOX est ajouté (FOX : H_2SO_4 (50mM), xylénol orange (100 μ M); $FeCl_2$ (250 μ M); hydroxytoluène butylé (4mM) dans du méthanol). L'incubation est de 30 minutes et la lecture au spectrophotomètre se fait à 560nm. On travaille en duplicata. Les valeurs d'absorbance sont comparées à celles d'une courbe étalon faite avec du H_2O_2 (0 – 100 μ M).

3.5.2. Dosage protéique

Le dosage des protéines, peu importe l'échantillon (cellules, tissus, ...), se fait par la méthode de Bradford. Selon le fabricant du réactif, BioRad, le principe repose sur la liaison du colorant Coomassie aux protéines. Cette association déprotone le colorant et modifie sa couleur qui est alors détectable à 595nm.

On ajoute d'abord aux échantillons du NaOH 1N pour favoriser la solubilisation des protéines membranaires et réduire la variation inhérente au dosage [192]. L'incubation en milieu basique se fait à 37°C pendant 1h. Pour les tissus animaux de notre modèle, les dilutions sont les suivantes : 5/16 pour le foie et le poumon traités au MPA lors du sacrifice; 1/4 pour les culots de sang total et de globules rouges traités au MPA lors du sacrifice. Pour les culots de cellules, on estime le volume et on ajoute 3 volumes de NaOH 1N. Une dilution supplémentaire de 1/250 dans l'eau nano pure est nécessaire pour tous les échantillons, sauf les cellules où la dilution est de 1/50. Cinquante µl de ces dilutions sont transférés dans des cuvettes spectrophotométriques. On y ajoute 1mL de réactif Bradford préalablement dilué 1/5 dans l'eau nano pure. L'incubation est de 10 minutes, puis on lit à 595nm. On travaille en duplicata. Les valeurs d'absorbance sont comparées à celles d'une courbe standard d'albumine de sérum bovin (BSA; 0 – 120pg/µL dosé).

3.5.3. Dosage de la créatinine

Le dosage de la créatinine dans l'urine permet de normaliser les résultats de concentration d'AscOOH urinaire. En effet, ceci permet de diminuer la variabilité intra- et inter-individus quant au volume et à la concentration de l'urine [193]. La créatinine est mesurée par un dosage colorimétrique de la réaction de Jaffé. La méthode utilisée est une adaptation de celle de Folin et Wu [194].

Après avoir été centrifugée 1 minute à 7 200g, les urines sont diluées 1/5 dans l'eau nano pure. 100µL de la dilution ou de standard sont transférés dans un tube de 1,5mL. On ajoute 200µL de tungstate de sodium (3,2% p/v) et 200µL d'acide sulfurique (0,2N). On mélange et les tubes sont re-centrifugés 1 minute à 7 200g. Le surnageant est prélevé et divisé dans deux autres tubes à raison de 200µL. À ce volume, on ajoute 100µL de picrate alcalin (ratio acide picrique 52,3mM:NaOH 2,5N de 9:1). L'incubation est de 20 minutes à la noirceur. Les solutions sont transférées dans des cuvettes spectrophotométriques et lues à 520nm. Les valeurs d'absorbance sont comparées à celles d'une courbe étalon de

créatinine (0 – 5mg/dL). Il est à noter que l'AsCH⁻ présent dans certains échantillons n'affecte pas le dosage de la créatinine (données non présentées).

3.5.4. Dosage des lipides plasmatiques et hépatiques

Les triglycérides (TG) et le cholestérol (CHOL) plasmatiques et hépatiques sont mesurés par spectrophotométrie en utilisant un kit commercial (Roche). Des courbes étalons de glycérol (0 – 2 mM) et de cholestérol (0 – 4,2 mM) sont préparées. À 50µL d'extrait de foie (voir ci-dessous) ou 10µL de plasma, 1mL de réactif à TG/CHOL est ajouté dans des cuvettes spectrophotométriques. Le témoin de réaction consiste en de l'eau nano pure. Après une incubation de 10 minutes, les échantillons sont lus à 500nm. On travaille en duplicata. Les valeurs d'absorbance sont comparées à celles de la courbe étalon et les données sont rapportées par mg de protéines.

Pour les échantillons hépatiques, une extraction organique est préalablement nécessaire : environ 300mg de foie congelé à -80°C sont homogénéisés au Polytron dans 2 volumes de salin 0,9% (p/v). De cela, 20µL sont prélevés, auxquels 20µL de NaOH 1N sont ajoutés. La solution est chauffée à 37°C pendant 1h, puis diluée 1/500. 100µL de l'homogénat dilué sont transférés dans des tubes de borosilicate de 8ml, et 2mL de réactif Folch (CHCl₃:Méthanol 2:1) sont ajoutés. La solution est agitée 1h à 4°C, puis 400µL de salin sont ajoutés. On centrifuge 10 minutes à 1 000g à 15°C. La phase supérieure est éliminée, et la phase inférieure contenant le chloroforme/méthanol est évaporée à sec sous azote. On re-suspend le contenu dans 100µL de Folch, auxquels 125µL de 2-dodecoxyethanol (Thesit) 20% (v/v, solubilisé dans le chloroforme) sont ajoutés. Une seconde évaporation permet d'obtenir un résidu huileux, lequel est émulsionné avec 1 250µl d'eau nano pure et un aliquot de la solution est lu à 500nm.

3.5.5. Dosage du lactate et pyruvate hépatiques

Le lactate et le pyruvate sont distinctivement mesurés par spectrophotométrie en utilisant un kit commercial dont les procédures sont les mêmes (BioVision). Un échantillon de 100mg de foie congelé à -80°C est pesé, auquel on ajoute 400µL du tampon commercial. On homogénéise au Polytron et une partie de l'homogénat, auquel on ajoute 1 volume de NaOH 1N, est conservé pour le dosage protéique. Puis, le restant de l'homogénat est centrifugé 2 minutes à 7 200g. Par la suite, 50µL du surnageant des homogénats sont transférés dans les puits d'une plaque de 96 puits. Un volume de 50µL du réactif

commercial (tampon:sonde:enzyme de 46:2:2) est ajouté dans chaque puit. L'incubation est de 30 minutes à la noirceur et la lecture au spectrophotomètre se fait à 570nm. On travaille en duplicata. Les valeurs d'absorbance sont comparées à celles d'une courbe étalon de lactate (0 – 200 μ M) ou de pyruvate (0 – 200 μ M).

3.5.6. Dosage du glucose et glucose-6-phosphate hépatique

La méthode utilisée est une adaptation du dosage enzymatique décrit par Bergmeyer *et al.* [195]. C'est un dosage en cinétique qui consiste d'abord à convertir le G6P par l'enzyme glycolytique G6P déshydrogénase (G6PDH) en présence de NADP⁺, puis à convertir le glucose en G6P en ajoutant l'hexokinase. On suit ainsi la formation de NADPH qui reflète l'activité de la G6PDH.

De façon pratique, on broie 100mg de foie à -80°C sur glace sèche, qu'on ajoute à 300 μ L d'acide perchlorique dans un tube de 50mL sur glace. On ajoute 1mL d'eau nano pure froide. L'homogénat est transféré dans un tube 1,5mL pour être centrifugé à 5 000g pendant 10 minutes à 4°C. 1mL du surnageant est prélevé. On y ajoute 290 μ L d'une solution de KOH 2M + imidazole 0,4M froid. On re-centrifuge à 5 000g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est conservé pour le dosage des protéines. Cinquante μ L du surnageant sont utilisés pour le dosage. On travaille en duplicata. Dans les cuvettes spectrophotométriques, on pipette successivement 20 μ L de NADP (20mM), 10 μ L de MgCl₂ (0,5M), 20 μ L d'ATP (150mM), 950 μ L de tampon triéthanolamine (0,4M) et 50 μ L de notre échantillon. On mélange et on lit à 340nm pendant les minutes 0, 1 et 2 (la moyenne = absorbance #1). On ajoute 5 μ L de G6PDH (0,25mg/ml), on mélange et on laisse réagir pendant les minutes 3, 4 et 5. On lit à 340nm durant les minutes 6, 7 et 8 (la moyenne = absorbance #2). On ajoute 5 μ L d'hexokinase (2,34mg/ml), on mélange et on laisse réagir pendant les minutes 9, 10 et 11. On lit à 340nm durant les minutes 12, 13 et 14 (la moyenne = absorbance #3). Comme le coefficient millimolaire d'extinction de NADPH est 6,22, on le divise de la différence entre l'absorbance 1 et 2 pour obtenir la concentration en G6P et on le divise de la différence entre l'absorbance 2 et 3 pour obtenir la concentration en glucose. Ces valeurs sont corrigées pour les facteurs de dilution et les données sont rapportées par mg de protéines.

3.5.7. Dosage du glycogène

La méthode utilisée est celle décrite par Kemp et Heijningen [196]. Pour l'extraction du glycogène, on homogénéise 25 à 75mg de foie congelé à -80°C dans 5mL de méthanol 80% (v/v). L'homogénat est centrifugé à 3 000 révolutions/minute pendant 5 minutes. On retire le surnageant, et au culot on ajoute 5mL de solution de déprotéinisation (acide trichloracétique 5% (p/v) + Ag₂SO₄ 3,21mM). On chauffe à 100°C pendant 15 minutes, puis on refroidit à l'eau courante. On centrifuge de nouveau (mêmes conditions), puis 333µL de surnageant sont prélevés. On leur ajoute 1mL de H₂SO₄ 36N. Même si la réaction est exothermique, on chauffe à 100°C durant 6 minutes, pour ensuite refroidir sous l'eau courante. Lorsqu'une solution de glucose est chauffée en présence d'acide sulfurique, une coloration bleue/rose apparaît et il y a absorbance à 520nm de façon proportionnelle à la concentration en glucose. On transfère les solutions dans des cuvettes spectrophotométriques et on lit à 520nm. On travaille en duplicata. Les valeurs d'absorbance sont comparées à celles d'une courbe étalon de glucose (0 – 800µM).

3.5.8. Détermination du statut redox

Le statut redox global du tissus est estimé par le statut redox du couple glutathion oxydé (GSSG)-glutathion réduit (GSH), tel que décrit par Schafer et Buettner [118]. Ce dernier est fonction de la concentration en GSH et en GSSG, et du ratio entre les deux formes. Le dosage du GSH et GSSG a été effectué par électrophorèse capillaire. La méthode a été précédemment développée au laboratoire et est détaillée dans le mémoire de Gauthier [197]. Elle a été publiée par Lavoie *et al.* en 2005 [35].

Brièvement, le surnageant de tissu acidifié au MPA est décongelé sur glace et dilué de 4 fois pour le sang total, les globules rouge et le poumon, ou de 5 fois pour le foie, dans l'eau dé-ionisée nano pure. Un volume de 50nl des dilutions est injecté sur le capillaire et le contenu séparé par électrophorèse sur le système *P/ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis* de Beckman Coulter. Le capillaire de silice fondue a 75µm de diamètre intérieure et 50cm de longueur. Le pH du tampon, composé de 75mM d'acide borique et de 25mM de bis-TRIS, est de 8,4. L'électrophorèse, d'une durée de 10 minutes, est exécutée à un voltage de 18 kV. La détection se fait dans l'UV à 200 nm. Les temps de rétention moyen sont de 7,32 ± 0,03 minutes (n=30) et de 7,75 ± 0,03 minutes (n=30) pour le GSH et le GSSG respectivement. La quantification est effectuée à l'aide d'une courbe étalon de GSH (0 – 100µM) et de GSSG (0 –

10 μ M) préparés dans le MPA 1% (p/v). Les limites de détection sont de 1,2 μ M et 0,05 μ M pour le GSH et GSSG, respectivement.

Par contre, l'électrophorèse capillaire n'était pas appropriée pour l'analyse redox dans le modèle cellulaire Caco-2, selon mes résultats préliminaires. J'ai dû utiliser la méthode du recyclage enzymatique du GSH qui ne mesure que la quantité totale de glutathion oxydé et réduit [198]. Cette mesure ne représente pas le statut redox cellulaire, car elle ne fournit pas les proportions de chacun, mais elle peut signaler des différences pertinentes dans le pool total de glutathion. Dans ce dosage, le GSSG est constamment recyclé par la GR en GSH, en présence de NADPH. Ce pool de GSH réagit avec l'acide dithio-bis-nitrobenzoïque (DTNB) pour former le thio-nitrobenzoate (TNB) et un adduit glutathion-TNB (GS-TNB). Le GS-TNB est recyclé par la GR. Le TNB formé est quantifié en suivant son absorbance à 412nm. De façon pratique, les échantillons de 100 μ L de cellules lysées dans le MPA 1% sont décongelés sur glace, puis centrifugés 5 minutes à 4°C à 7 200g. Le surnageant est dilué 1/25 dans le MPA 1% pour le dosage, et le culot conservé pour la détermination des protéines. Dans les cuvettes spectrophotométriques, on ajoute tour à tour 700 μ L de tampon phosphate de potassium (5mM d'EDTA disodique dans une solution contenant 16% de KH₂PO₄ 100mM + 84% de K₂HPO₄ 100mM), 60 μ L de DTNB (1,7mM), 60 μ L de la solution enzymatique (4U/mL), et 100 μ L d'échantillon ou de standard. Trente secondes plus tard, on ajoute 60 μ L de NADPH (0,9mM). On mélange bien, et on commence la lecture à 412nm. Pour la quantification, on compare la pente des changements d'absorbance entre les minutes 2 et 4 aux pentes obtenues avec une courbe étalon de GSH (0 - 3,2 μ M).

3.6. Analyses statistiques

Selon le design expérimental, les résultats étaient soit exprimés par une relation linéaire expliquée par le ratio des carrés (r^2), soit exprimés selon la moyenne \pm SEM. Le test statistique est toujours l'ANOVA. Lorsque applicable, l'homoscédasticité est d'abord vérifiée par le test du χ^2 de Bartlett. Le niveau de signification des tests est fixé à $p < 0,05$. Il est à noter que, à moins d'avis contraire, les expériences et protocoles expérimentaux décrits précédemment ont été accomplis 3 fois ($n=3$), sauf pour les modèles linéaires où les statistiques s'effectuent sur une régression composée d'au moins $n=3$ points.

4. Résultats

4.1. Validation de la méthode de dosage quantitatif de l'ascorbylperoxyde au LC-MS

4.1.1. Optimisation de la détection au MS

Premièrement, en utilisant la méthode de Knafo, j'ai procédé à la calibration des principaux ions détectés par MS. En injection directe, le LC-MS fut programmé pour détecter les ions dans un registre de deux dixièmes de leur m/z ; par exemple, $135,0 \pm 0,2 m/z$, $191,0 \pm 0,2 m/z$ et $207,0 \pm 0,2 m/z$. La valeur exacte de m/z avait toujours la réponse la plus abondante. On reviendra sur l'identification des analytes d'intérêt.

Puis, toujours selon la même méthode, j'ai testé l'effet d'une solution tampon d'acétate d'ammonium (33mM, car lu dans un article [199]) comme phase mobile à la place de l'eau sur l'ionisation de l'AscOOH (∴ sur sa détection). L'abondance absolue de l'AscOOH (m/z 207) était significativement plus élevée lorsque l'acétate d'ammonium était utilisée ($419\,870 \pm 30\,583$ vs $211\,047 \pm 55\,988$, $p < 0,05$). La solution d'acétate d'ammonium gardait le pH autour de la neutralité peu importe le rapport avec l'ACN. Peu de temps après cette détermination, la concentration d'acétate d'ammonium fut diminuée à 10mM afin de diminuer la suppression ionique possible et après observations qualitatives que la chromatographie et la détection n'étaient pas affectés négativement par ce changement.

Enfin, en injectant directement 20 μ L d'un système générateur 8% équiv. MV sur le LC-MS avec des mesures en scan, j'ai fait varier le voltage d'ionisation de 20V à 90V avec des intervalles de 10V. Les spectres de masse obtenus sont présentés à la page 118 en annexe (Figure 61) afin de ne pas alourdir le texte. Grosso modo, plus le voltage est bas, plus c'est l'ion m/z 207 qui est détecté. Avec l'augmentation du voltage, cette masse se fragmente et engendre la formation de l'ion m/z 135, qui se fragmente progressivement en un ion de m/z 75. Ce résultat fut confirmé également dans l'urine (données non présentées). Pour diminuer la fragmentation de l'AscOOH, un voltage de 25V fut choisi pour ma méthode, par rapport à celui de 70V initial. Donc, à moins d'avis contraire, toutes les données présentées ici ont été faites au MS avec un voltage d'ionisation de 25V.

4.1.2. Choix de la phase mobile et optimisation de la chromatographie

Pour une meilleure identification des composantes du système générateur et par conséquent une quantification optimisée de l'AscOOH, la méthode de chromatographie liquide fut développée. Avec les phases mobiles discutées précédemment (ACN et acétate d'ammonium), après vérification de leur compatibilité avec ma chromatographie, plusieurs gradients furent testés pour l'analyse de l'AscOOH urinaire. Il est à noter que la chromatographie en mode isocratique (mélange de phases mobiles constant) ne donnait pas de bons résultats et n'était pas reproductible. Ainsi, un premier gradient fut testé (❶) passant de 40 à 70% d'ACN (par rapport à l'eau HPLC) en 20 minutes avec un débit de 0,250ml/min. Un second (❷), passant de 50 à 70% d'ACN (vs eau HPLC) en 15 minutes avec un débit de 0,3ml/min. Puis, un troisième (❸), passant de 100 à 50% d'ACN (vs tampon acétate d'ammonium 33mM) en 10 minutes avec un débit de 0,4ml/min. Ces gradients communs, avec concentrations élevées en ACN, devaient retarder l'éluion des analytes plus polaires, mais la colonne n'y était pas adaptée, comme on l'observe à la Figure 18. Les chromatogrammes d'urines illustrés ont été analysés au MS en mode SIM et non en mode scan. Ils sont inacceptables pour mon dosage. Le dernier scan (❹) montre le résultat, plus acceptable, d'un gradient passant de 10 à 90% d'ACN (vs tampon) en 15 minutes à 0,4ml/min.

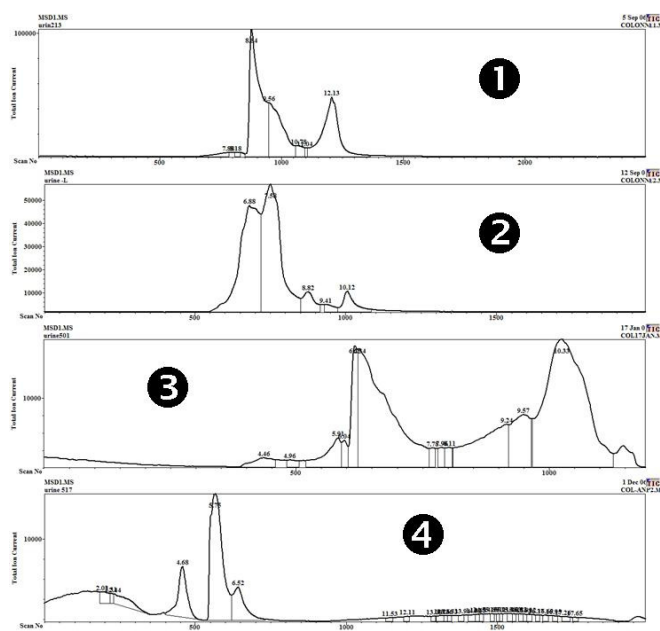


FIGURE 18. Différents chromatogrammes d'urines résultant de la mise au point de la chromatographie.

En fin de compte, grâce à l'aide d'un doctorant du laboratoire, Khalil Miloudi, une chromatographie acceptable et surtout reproductible a été obtenue. La méthode se caractérisait par un gradient passant de 0 à 100% d'ACN (vs un tampon d'acétate d'ammonium 10mM) en 20 minutes avec un débit de 0,8ml/min. Des exemples de chromatogrammes obtenus lors d'analyses sont présentés à la Figure 19. Ces figures représentent la somme des pics des m/z détectées au LC-MS, somme qui est appelée TIC (pour « Total Ion Current ») et de laquelle on peut extraire les chromatogrammes séparés de chaque m/z . Par contre, les essais pour prolonger le gradient dans le temps, et donc améliorer la séparation, ont tous été vains. Malgré une séparation qui n'est pas optimale, la méthode décrite ici s'est avérée fonctionnelle et reproductible.

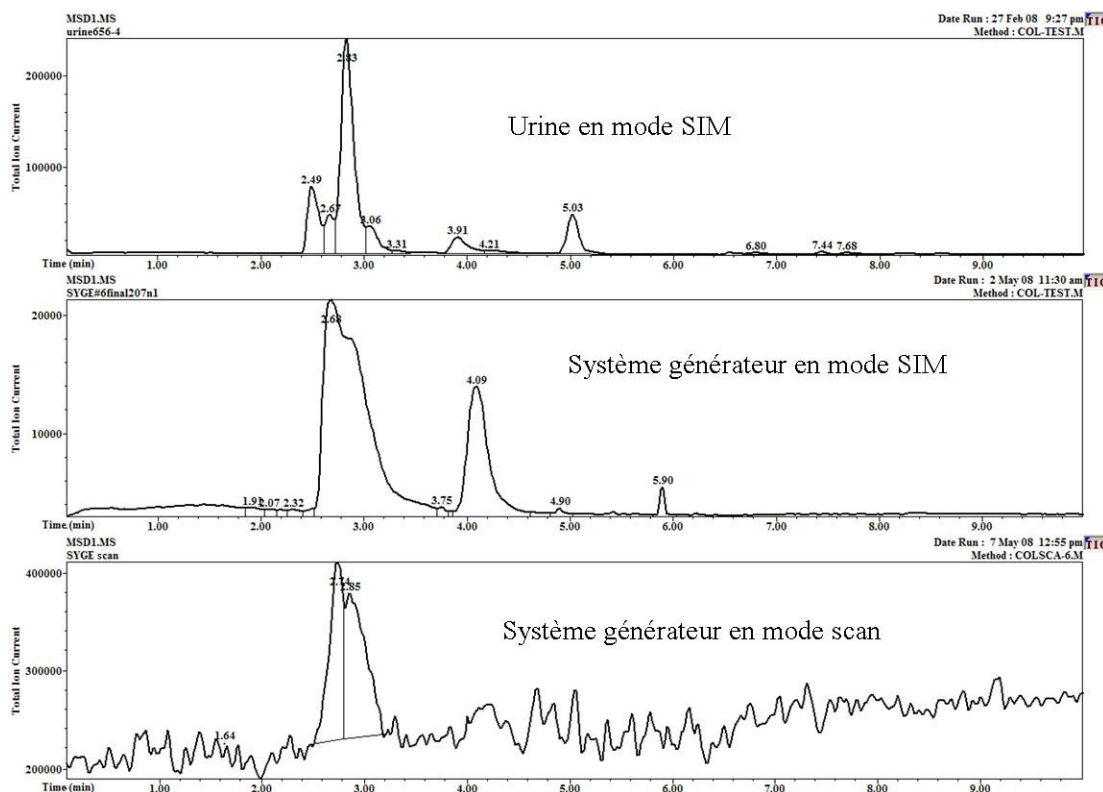


FIGURE 19. Chromatogrammes types avec la méthode chromatographique retenue. En SIM, les ions détectés étaient m/z 135, 175, 191, 207, 209, 146, 293.

D'abord, pour connaître le profil chromatographique de l'AscH⁻, du DHA, du DKG et du thréonate par cette méthode, j'ai procédé à des analyses en scan de solutions simples et pures de chacun de ces composés (5mM). Voici les réponses, avec les spectres de masse des pics principaux.

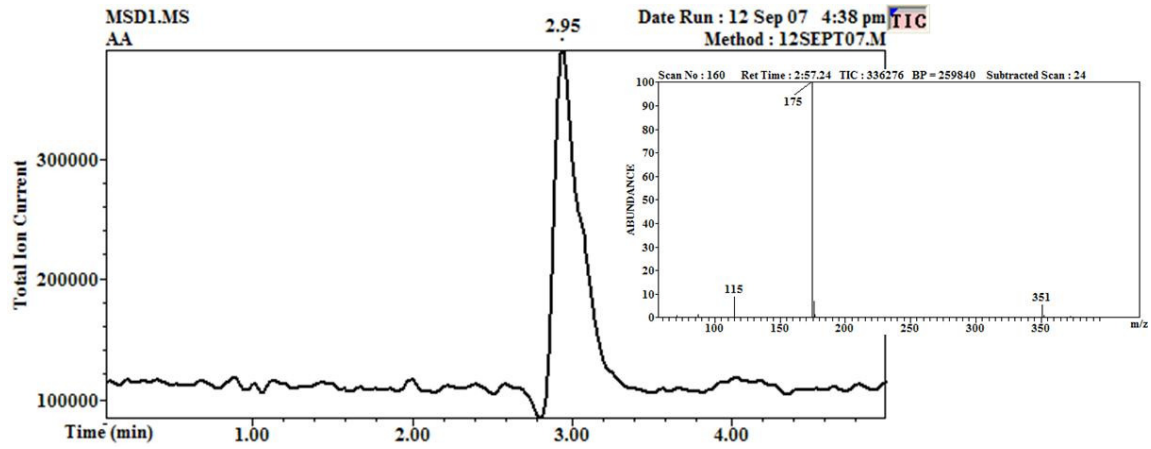
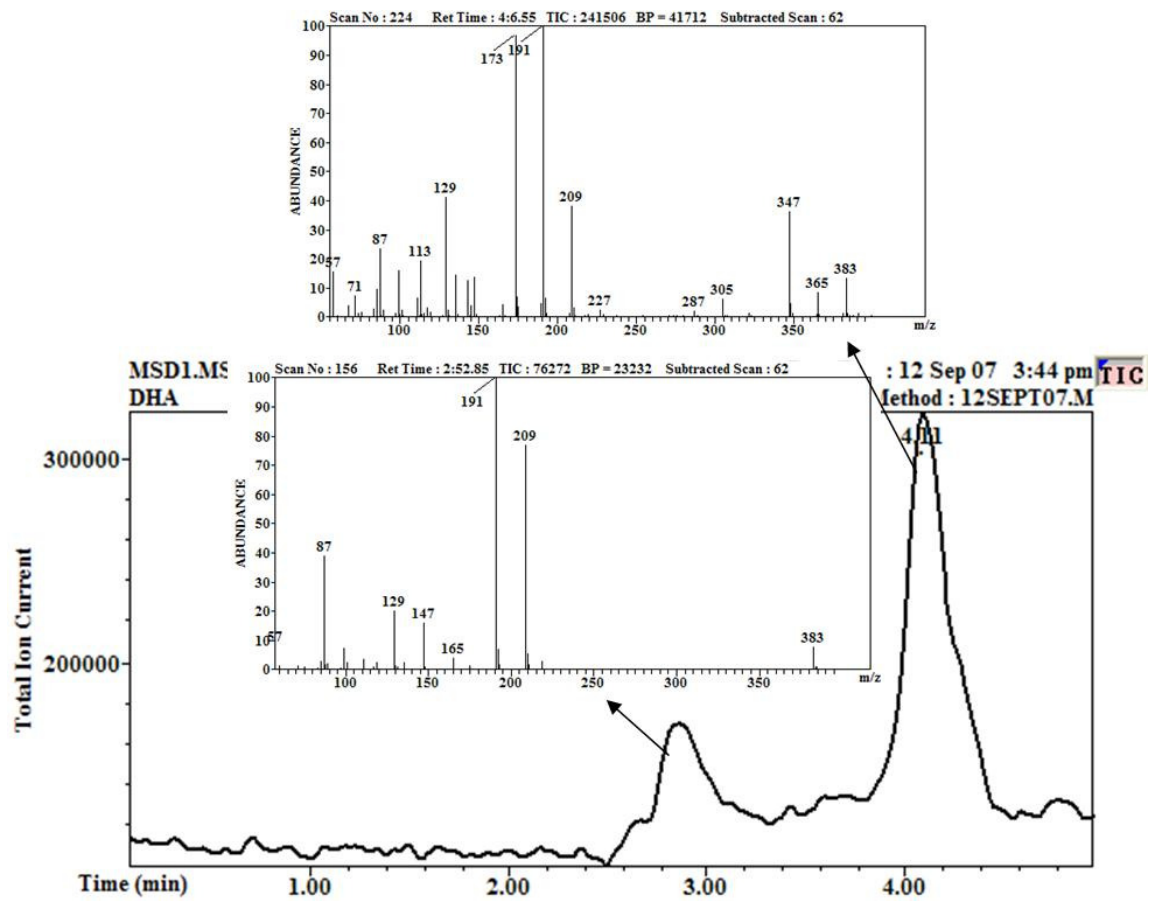
FIGURE 20. Résultat de l'analyse de l'AsCH⁻ au LC et au MS.

FIGURE 21. Résultat de l'analyse du DHA au LC et au MS.

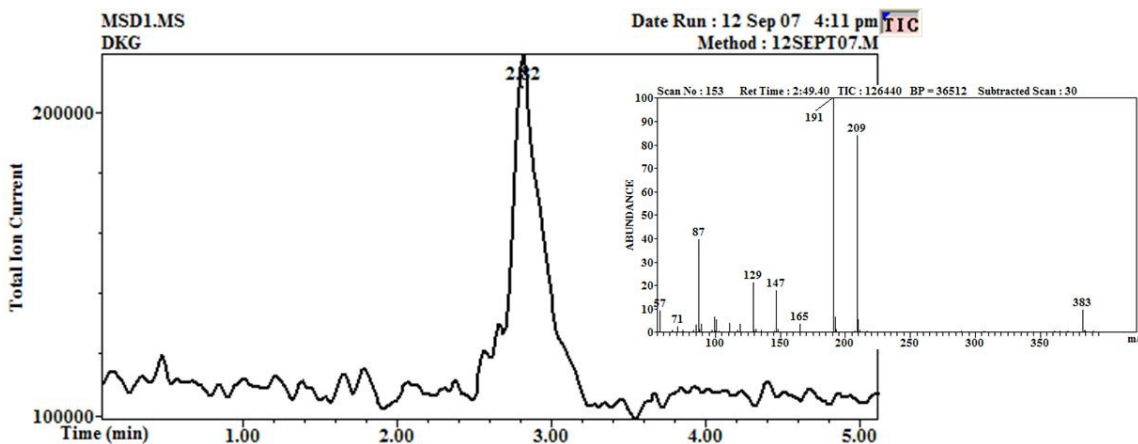


FIGURE 22. Résultat de l'analyse du DKG au LC et au MS.

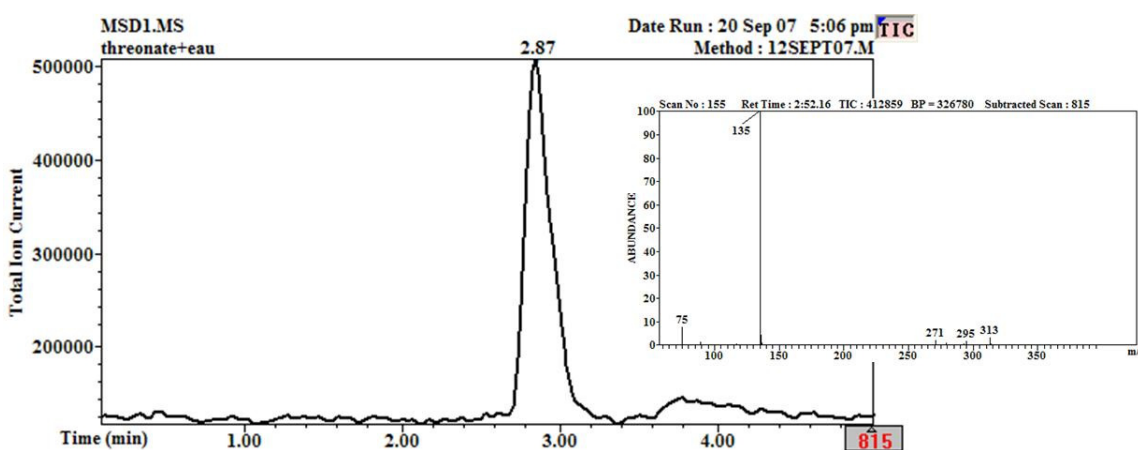


FIGURE 23. Résultat de l'analyse du thréonate au LC et au MS.

Ainsi, il est possible d'identifier les pics et les m/z correspondantes à toutes les molécules en jeu ici. Par exemple, l'ion à m/z 135 peut être du thréonate si le pic ne sort pas au même temps de rétention que l'ion à m/z 207. Au même temps de rétention que l'ion m/z 207, c'est la fragmentation de l'AscOOH. L'ion à m/z 175 est de l'AscH⁻, avec son dimère à l'ion m/z 351, et ils apparaissent aux environs de 3 minutes. Le DKG, non hydraté et hydraté (m/z 191 et 209), sort aux environs de 2,8 minutes. Toutes ces molécules sont petites et polaires, donc peu retenues sur la colonne C18. Le DHA, qui est un peu moins hydrophile et qui comporte plusieurs formes en solution, sort à deux temps de rétention aux m/z 173, 191 et 209. Mais comme le DHA est très instable, on l'observe rarement en pratique et les pics des m/z 191 et 209 sont plutôt du DKG.

D'ailleurs, un enrichissement croissant en DKG dans mon urine centrifugée et filtrée (filtre de 0,45 μ M) a permis de confirmer que les pics de m/z 191 et 209 au temps \sim 2,8 min était attribuables au DKG. Voici les chromatogrammes de l'urine non enrichie, et celle

enrichie de 5mM de DKG (Figure 24). Les chromatogrammes de couleur rouge et vert représentent les m/z 191 et 209, respectivement. Le pic de m/z 191 à environ 2,5 minutes semble être constitutivement présent dans les urines. L'échelle des quantités absolues en ordonnée est éloquent.

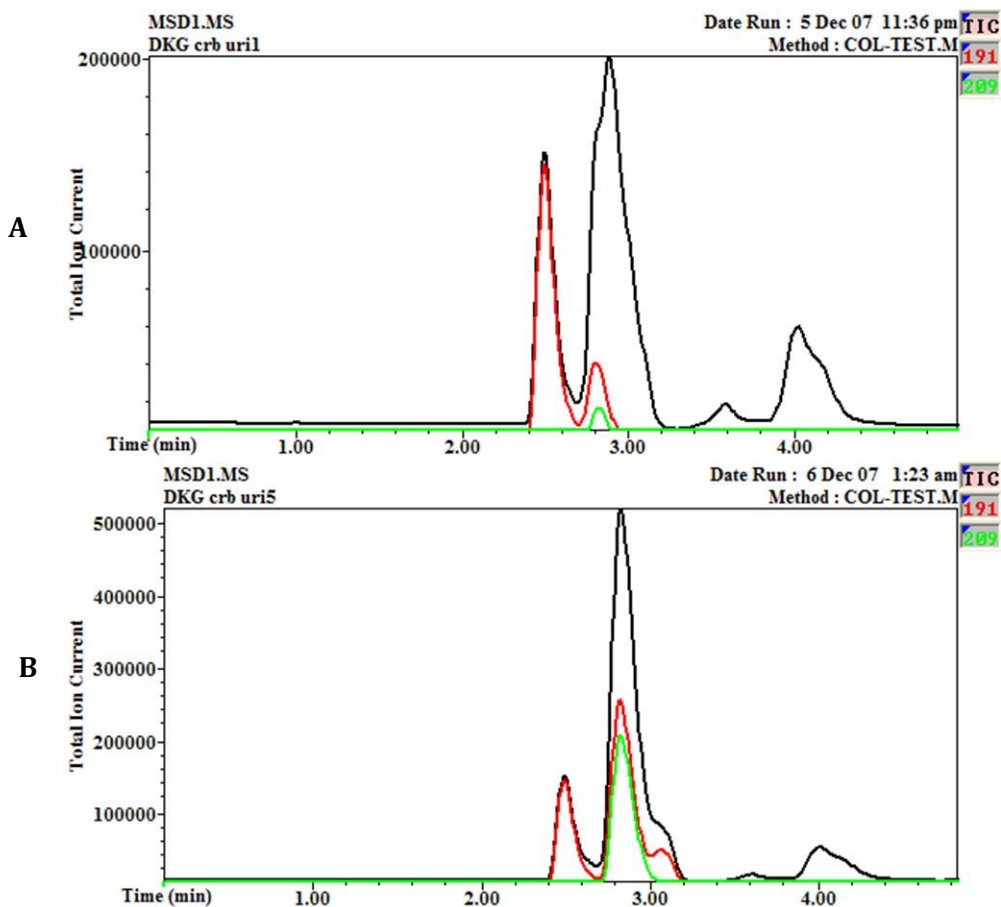


FIGURE 24. Enrichissement d'un échantillon d'urine en DKG (concentration finale 5mM) pour confirmer son temps de rétention. A = éch. urinaire; B = éch. urinaire enrichi en DKG.

Puis, j'ai procédé à l'enrichissement d'un échantillon d'urine avec une concentration croissante d'un système générateur (concentration finale de 0 à 20% équiv. MV) qui n'avait pas réagi complètement, i.e. il restait de l'AscH⁻ (Figure 25). On voit d'ailleurs que l'AscOOH était peu abondant relativement à l'AscH⁻, et que pour cette raison, son fragment à la m/z 135 n'était pas visible. Voici donc les chromatogrammes de l'urine témoin (non enrichie) et celle enrichie avec le système générateur (concentration finale de 20% équiv. MV), avec les différentes m/z surveillées extraites en couleur. On remarque bien l'enrichissement d'AscH⁻, de DKG et surtout d'AscOOH (en bleu) (Figure 25).

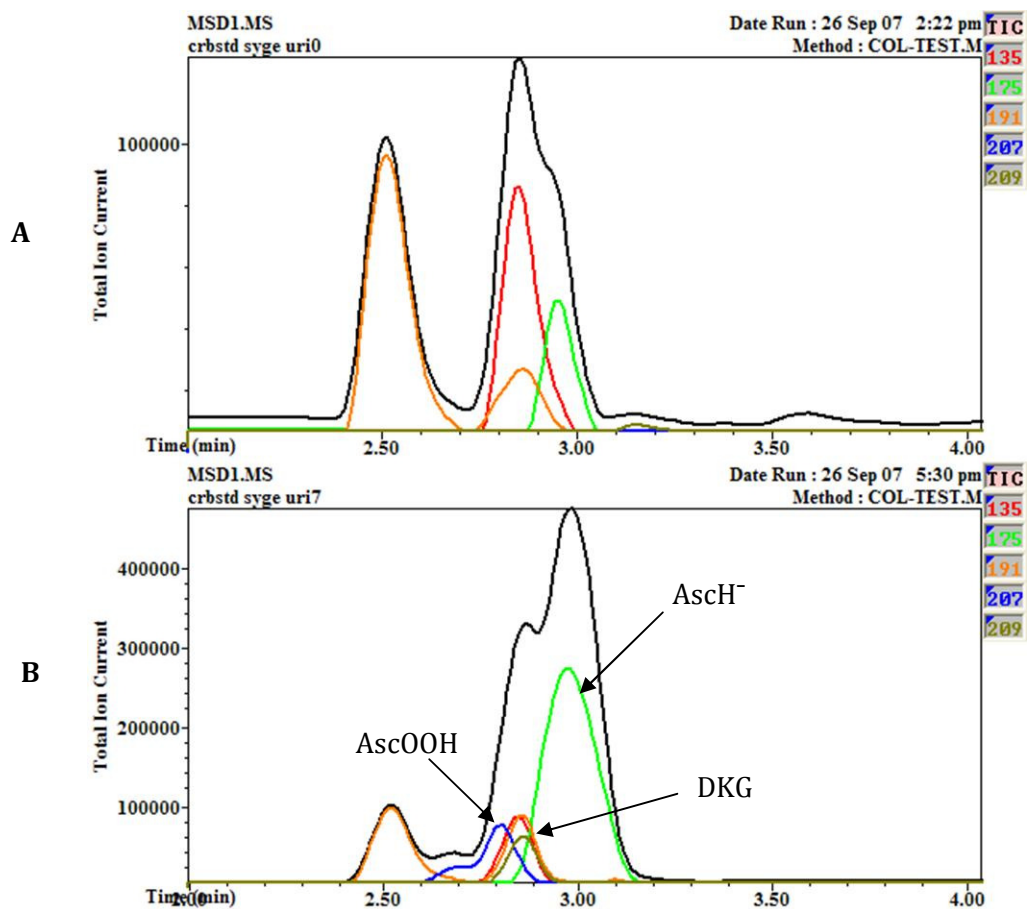


FIGURE 25. Enrichissement d'un échantillon d'urine avec un système générateur pour l'identification des analytes d'intérêt. A = éch. urinaire; B = éch. urinaire enrichi avec un système générateur.

Voici finalement le chromatogramme d'une analyse en scan d'un système générateur 1% équiv. MV qui a réagit complètement, avec le fragmentogramme présenté à la page 74.

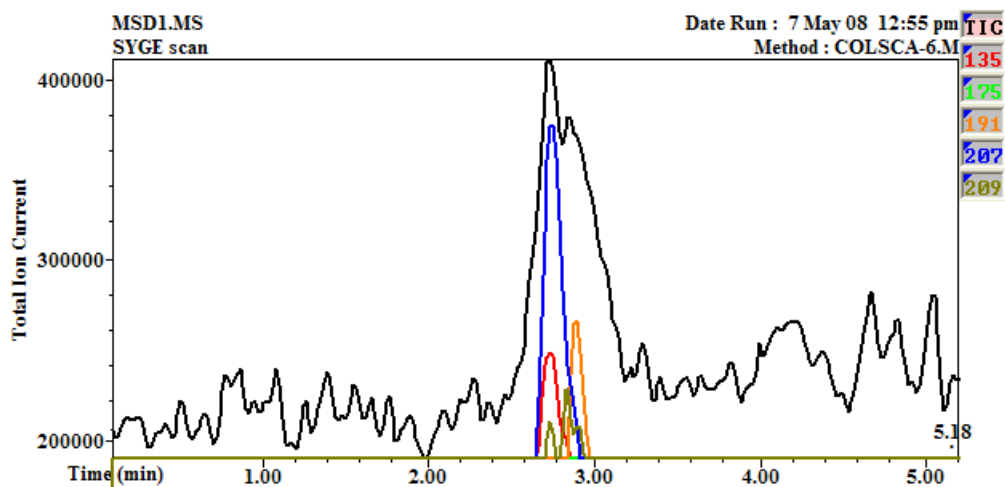


FIGURE 26. Résultat d'une analyse en scan (m/z 50 - 600) d'un système générateur.

4.1.3. Seuils de détection et de quantification

Le seuil de détection de l'AscOOH est de 0,43 μ M, tel qu'indiqué par l'intervalle de confiance (couvrant 95% de la population) autour de l'ordonnée à l'origine d'une courbe étalon du signal absolu au MS en fonction de la concentration en AscOOH (en μ M équivalent OTC).

4.1.4. Coefficients de variation (intra- et inter-essai)

Avec un système générateur, le coefficient de variation intra-essai est de 2%, et de 4% avec un mélange d'urines. La variation inter-essai déterminé avec l'urine est de 11%. Or, l'ajout d'un étalon interne permet de compenser pour ces variations.

4.1.5. Choix de l'étalon interne

La possibilité de retrouver du glucose endogène dans certains échantillons biologiques peut fausser la quantification s'il est utilisé comme étalon interne. De plus, les essais préliminaires de l'injection directe de glucose (0 – 10mM) sur le LC-MS ont montré que l'ionisation se faisait mal. Cette molécule étalon a été écartée et l'OTC décrit précédemment fut alors essayé, étant une molécule synthétique exogène.

4.1.5.1. Détection et stabilité

D'abord, l'OTC s'ionisait correctement au MS, et présentait deux ions principaux : le monomère à la m/z 146 et le dimère à la m/z 293 (Figure 27). Au voltage utilisé, 25V, c'est davantage le dimère qui est détecté. En chromatographie, les deux pics sortent au même temps de rétention, soit à environ 4 minutes, bien après mes analytes d'intérêt. Le fait que les deux m/z apparaissent au même temps de rétention signifie probablement que la dimérisation se fait à l'ionisation dans la source du MS. La réponse de l'OTC sera donc la somme de la réponse du pic de l'ion m/z 146, plus deux fois la réponse du pic de l'ion m/z 293.

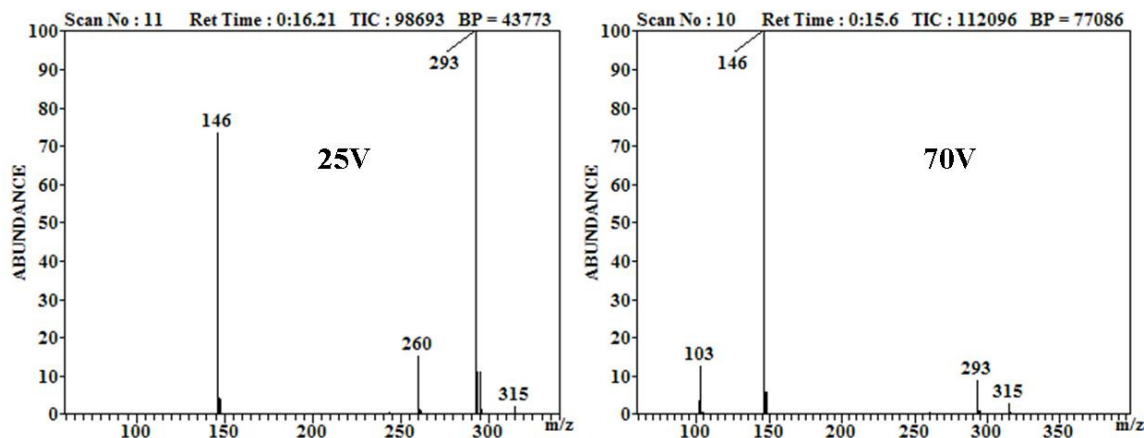


FIGURE 27. Analyse en scan de l'OTC (5mM) au MS en injection directe à 25 et 70V.

La stabilité d'une solution de 2,5mM d'OTC a été évaluée sur 167 jours en conservant les échantillons d'OTC à -20°C. Les statistiques ont été faites sur les abondances absolues de l'OTC et dans le temps. Bien que la réponse absolue fluctue, la pente de la régression réponse/temps obtenue n'était pas significativement différente de zéro. L'utilisation du congélateur -80°C fut toutefois préférée pour maximiser la conservation du stock d'étalon.

4.1.5.2. Courbes de calibration

D'abord, la réponse de l'OTC au MS était linéaire jusqu'à environ 1mM (Figure 28).

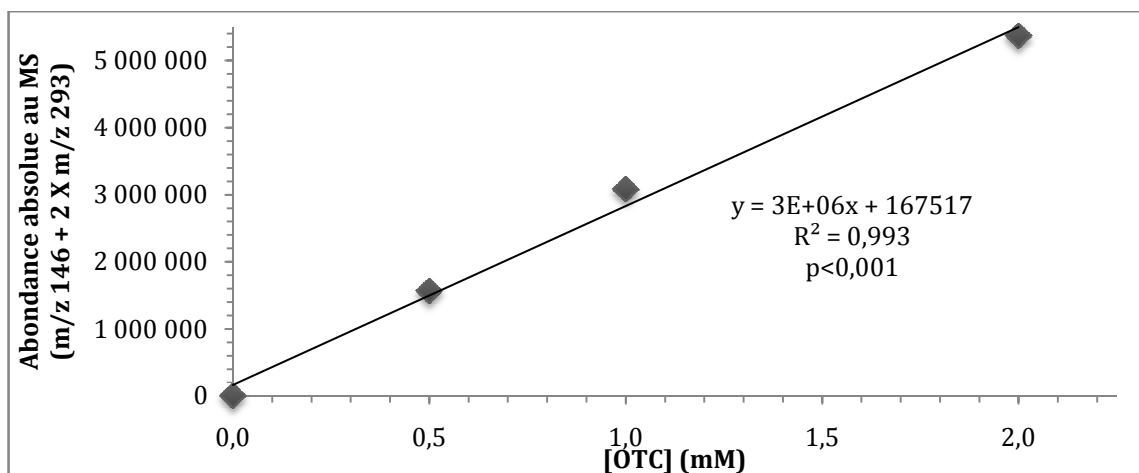


FIGURE 28. Courbe étalon externe de l'OTC.

Pour l'utilisation de l'OTC comme étalon interne, il est préférable de choisir une concentration où la linéarité de la réponse est maximale, mais surtout une concentration proche de celle de l'analyte qui sera dosé [200], on reviendra à la concentration idéale. Aussi, il me fallait vérifier la linéarité du ratio des abondances (AscOOH/étalon) en faisant des courbes de calibration interne, tel qu'expliqué à la section 3.2.2.4. J'ai utilisé les deux

matrices qui seraient fréquemment analysées pour faire les courbes : d'abord un système générateur (Figure 29), puis des urines (Figure 30). Dans une courbe de calibration interne, la concentration de l'étalon est constante et celle de l'analyte est croissante. Or, comme on ne connaît pas les quantités réelles d'AscOOH ni dans les urines, ni dans les systèmes générateurs avant analyse, la concentration croissante de l'AscOOH est estimée soit par la concentration globale du système générateur (% équiv. MV), soit par le volume d'urine dans la solution. La régression est toujours linéaire et très significative ($p < 0,05$).

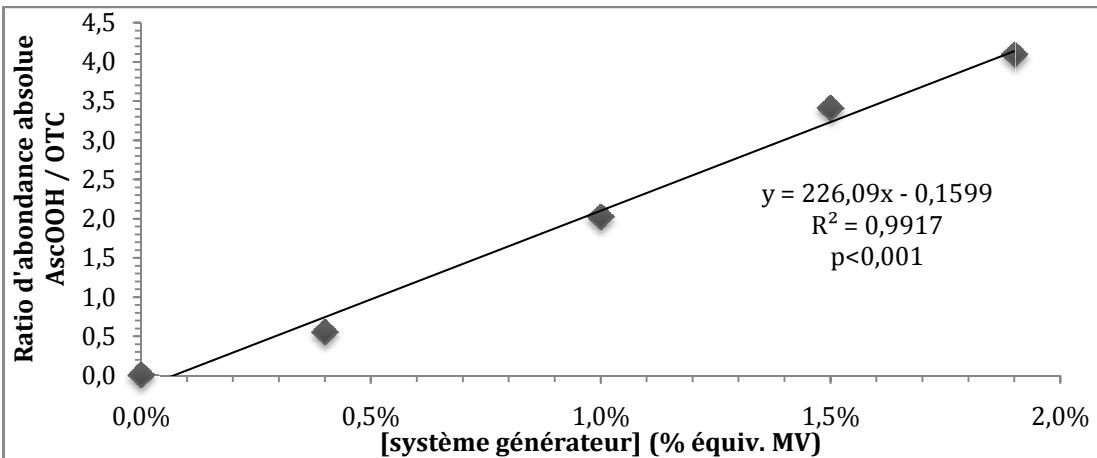


FIGURE 29. Courbe étalon interne de l'OTC dans un système générateur.

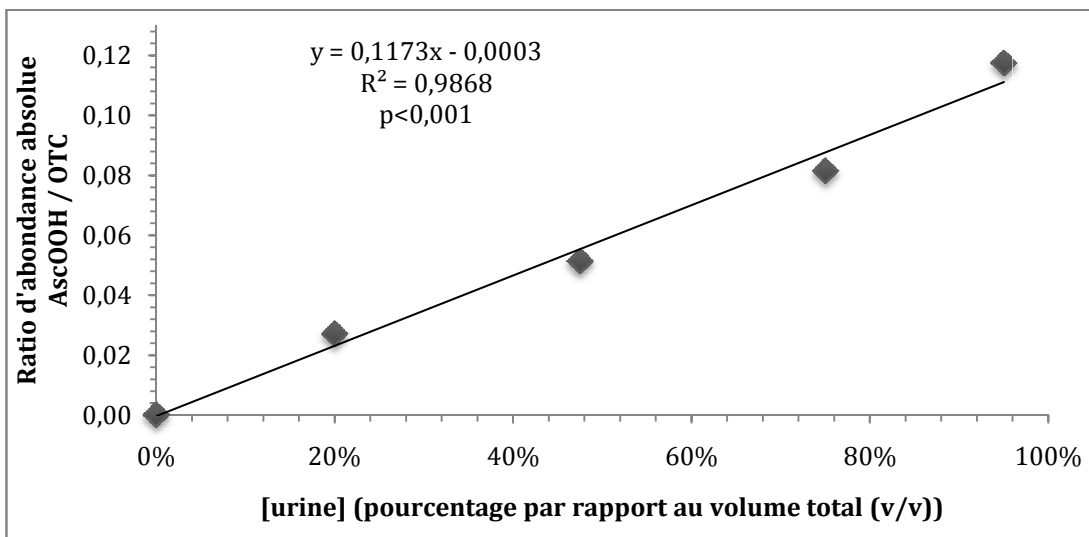


FIGURE 30. Courbe étalon interne de l'OTC dans une urine.

Enfin, l'effet du pH de la matrice (2 à 9) ne perturbe pas la détection de l'OTC au MS. En effet, la pente de la régression obtenue – réponse absolue au MS (m/z 146 + 2 × m/z 293) en fonction du pH – n'était pas significativement différente de zéro.

4.1.5.3. Courbe d'enrichissement

À l'inverse de la courbe de calibration, la courbe d'enrichissement consiste à faire varier la concentration de l'étalon interne pour une même concentration de notre analyte afin de valider à nouveau l'absence d'interaction entre étalon et analyte. On utilise la même gamme de concentrations que la courbe de calibration. Ici, j'ai fait l'expérience seulement dans une urine centrifugée et filtrée, étant donné que l'urine est la solution qui présente la matrice la plus complexe par rapport au système générateur. La concentration finale de l'OTC variait entre 0 et 1mM, alors que le volume et la « concentration » de l'urine étaient gardés constants. Ici aussi, le ratio des réponses est linéaire et significatif.

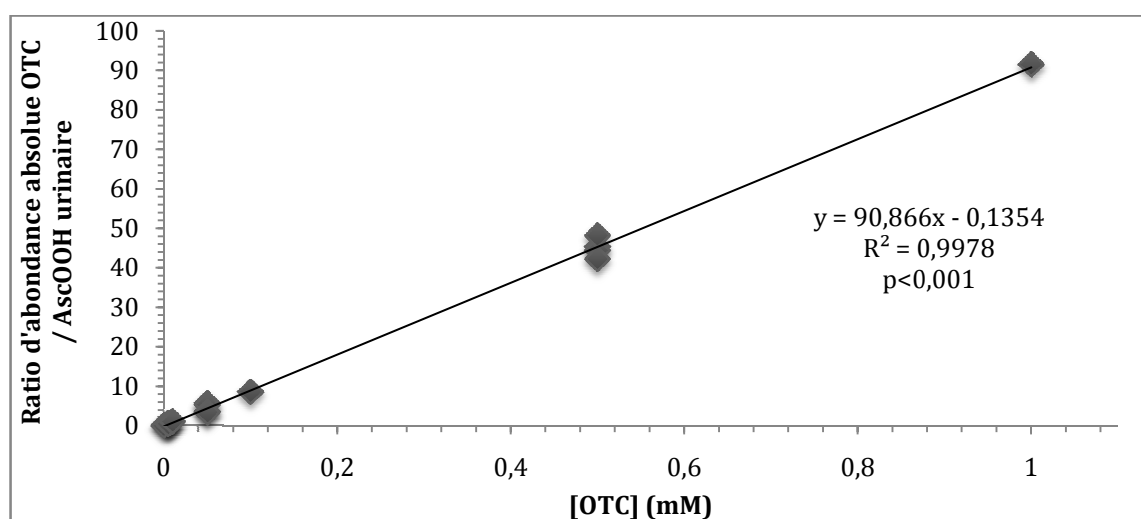


FIGURE 31. Courbe d'enrichissement de l'OTC dans un échantillon d'urine.

Par conséquent, l'OTC s'avère être un bon candidat pour le rôle d'étalon interne dans le dosage de l'AscOOH. La concentration de l'AscOOH dosé sera donc donnée en μM équivalent OTC (μM équiv. OTC). Le stock de 2,5mM est conservé au congélateur -80°C et mélangé à l'échantillon à analyser seulement avant l'analyse à raison d'une dilution 5% v/v (concentration finale d'OTC à $125\mu\text{M}$).

4.1.6. Système générateur d'ascorbylperoxyde

D'abord, la Figure 32 présente le spectre de fragmentation en injection directe sur LC-MS, à 25V, d'un système générateur 8% équiv. MV photo-exposé jusqu'à complétion de la réaction. On peut y observer les molécules résultantes de la réaction de photo-oxydation de l'AscH⁻. Il est à noter que la R_f n'apparaît pas car son ionisation est faible en mode négatif. L'AscOOH (m/z 207) est majoritairement formé, avec son fragment à m/z 135.

L'identification des principaux ions présents a été effectuée précédemment. L'ion à la m/z 191 est du DKG, principalement. La m/z 163 est fort probablement l'acide 3,4,5-trihydroxy-2-cétopentanoïque, un produit de dégradation du DKG. Il est à noter l'absence d'AscH⁻, dont la dégradation est complète. Les autres m/z n'ont pas été identifiées.

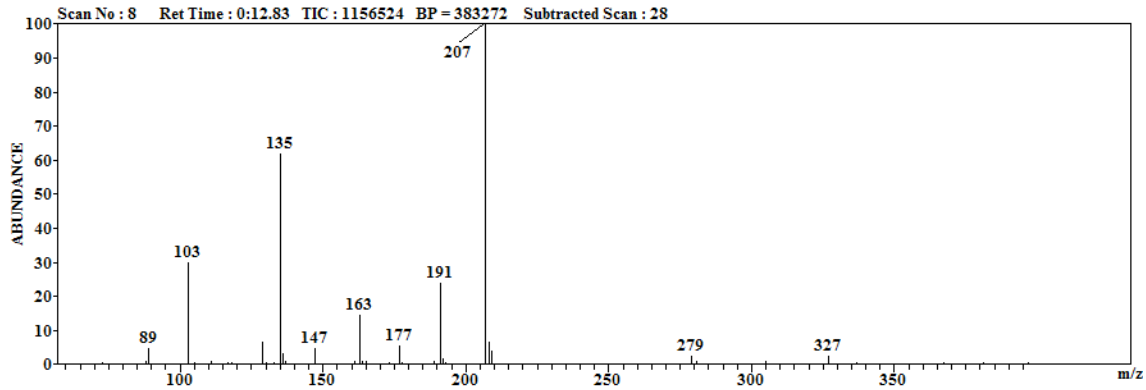


FIGURE 32. Fragmentogramme d'un système générateur photo-exposé analysé en injection directe.

En outre, l'effet de l'intensité lumineuse sur la formation de l'AscOOH fut testé en plaçant des échantillons d'un système générateur 2% équiv. MV à des distances croissantes d'une source lumineuse (fluorescent standard) dans une chambre noire. Rappelons que l'intensité de la lumière décroît au carré de la distance. Durant l'incubation, des volumes étaient prélevés et dilués 1/10 dans l'eau pour injection directe sur le LC-MS en surveillant les m/z d'intérêt. On constate (Figure 33) que la distance de la lampe (\therefore l'intensité) influençait significativement l'abondance d'AscOOH durant les premières heures (2,5 et 4h), mais qu'après 24h, l'effet n'était plus significatif et on retrouvait de l'AscOOH même à la condition -Lux (non exposée à la lumière).

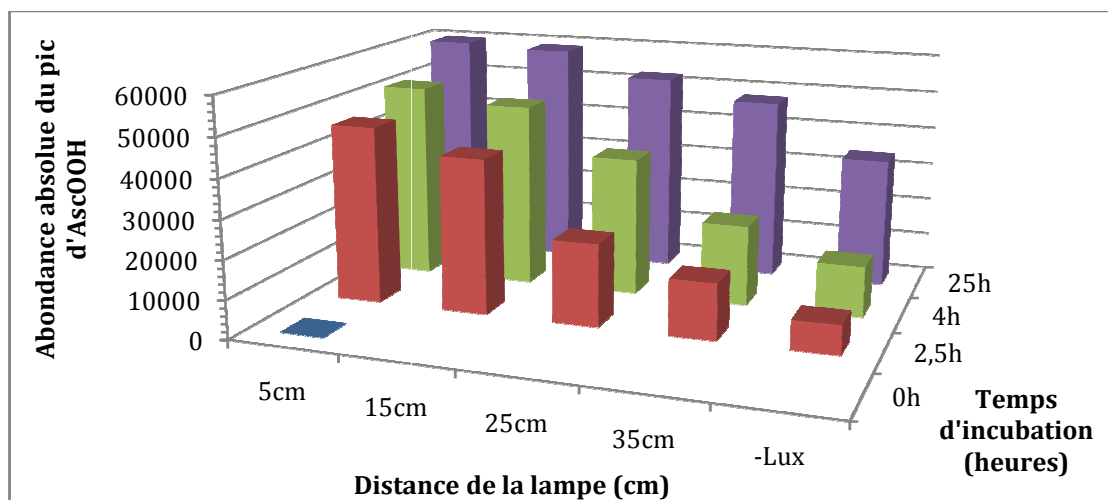


FIGURE 33. Effet de l'intensité lumineuse sur la formation d'AscOOH.

Ensuite, le pH optimal pour la génération d'AscOOH a été déterminé dans un système générateur 2% équiv. MV (Figure 34). Comme on l'observe, le pH a une grande influence sur la réaction de photo-oxydation de l'AscH⁻. Un système générateur non ajusté avec du NH₄OH a un pH d'environ 5. Mes expériences ont montré qu'à ce pH, la génération d'AscOOH est très lente et la formation de DKG est favorisée. La neutralité du pH est la condition idéale.

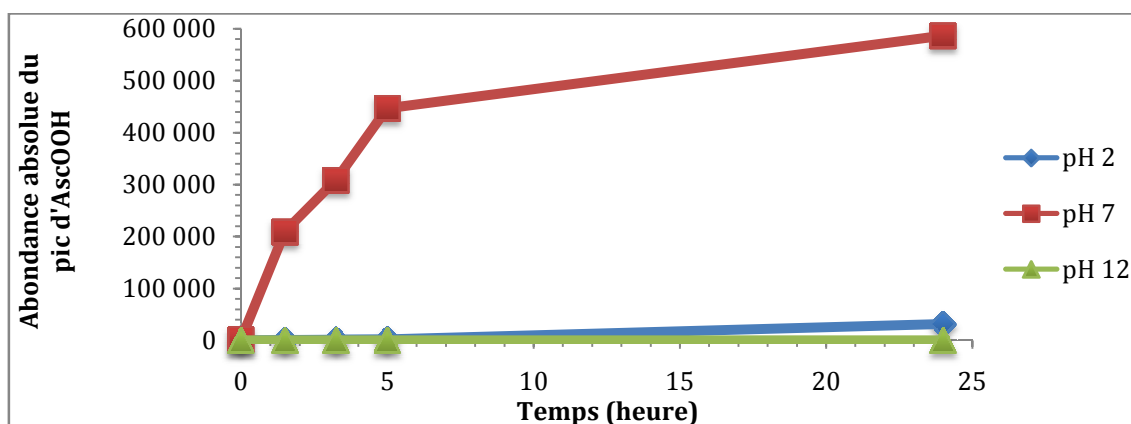


FIGURE 34. Formation de l'AscOOH en fonction de trois pH.

En outre, l'effet de l'aération sur la formation de l'AscOOH dans le temps a été testé pour deux concentrations de systèmes générateurs, l'un de 5% équiv. MV (4,5mM d'AscH⁻ initial) et l'autre de 24% équiv. MV (22,5mM d'AscH⁻ initial) (Figure 35). Chaque solution a été distribuée dans 3 béchers identiques (capacité 100mL) à raison de 25mL, 50mL ou 75mL afin de faire varier le ratio surface/volume (0,72 - 0,36 - 0,24). Il faut mentionner que l'AscOOH est maintenant donné en concentration équivalente à l'étalon puisque la méthode de quantification était à point lors de l'expérience.

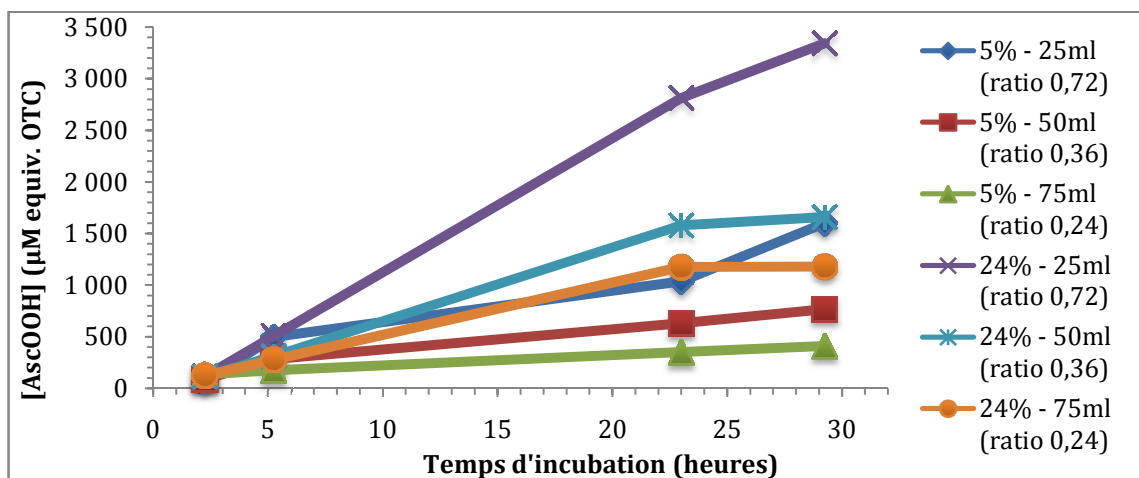


FIGURE 35. Formation d'AscOOH selon le rapport surface/volume du système générateur.

On remarque que plus le ratio surface/volume est grand – signifiant un meilleur accès à l'air ambiant – plus la formation d'AscOOH est rapide. Il est à noter que la différence entre les pentes des ratios 0,72 et 0,36 est significative ($p < 0,05$) pour les deux concentrations. D'ailleurs, si on ajoute un agitateur magnétique et un flot d'air (bulles) au système générateur 5% équiv. MV (50mL dans bécher de 100mL), on accélère aussi la formation de l'AscOOH :

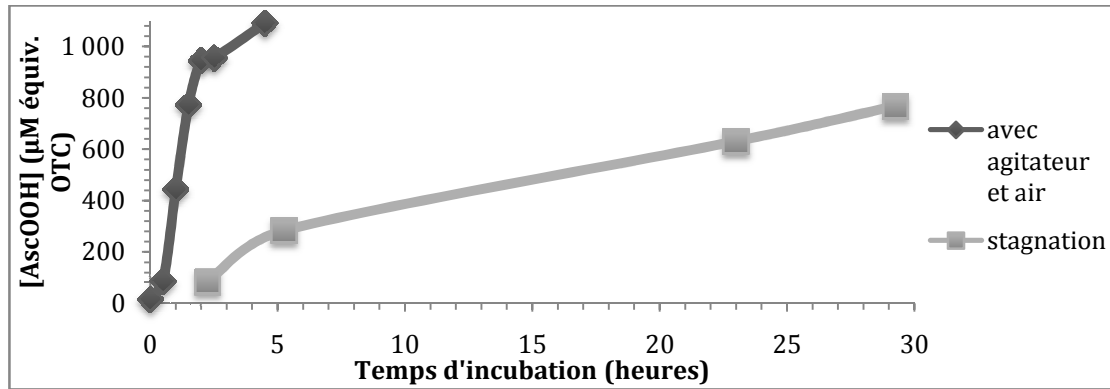


FIGURE 36. Effet de l'aération du système générateur (5% équiv. MV) lors de l'incubation.

En outre, l'effet de différentes concentrations de Rf pour une même concentration d'AscH⁻ a été testé sur la génération d'AscOOH. Ici, pour 1,8mM d'AscH⁻ initial, j'ai mis 3 μM (0,17% de l'AscH⁻), 30 μM (1,67% de l'AscH⁻), 100 μM (5,56% de l'AscH⁻) ou 300 μM (16,67% de l'AscH⁻) de Rf. J'ai ajusté le pH à $\sim 7,5$ et exposé à la lumière pendant 24h. 1,67% de Rf par rapport à l'AscH⁻ est le ratio courant dans l'HAIV et dans les systèmes générateurs. L'AscOOH a été mesuré à la fin de l'incubation. On peut en conclure que la concentration de Rf influence la vitesse de réaction puisqu'à partir du seuil de 1,67% le maximum d'AscOOH avait été généré en cette durée. Sous ce seuil, la formation d'AscOOH semble incomplète au temps 24h (Figure 37).

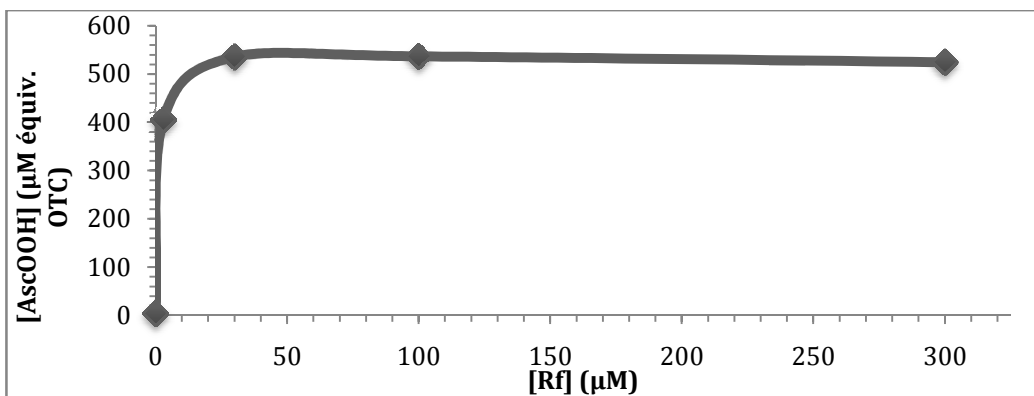


FIGURE 37. L'effet de la concentration de la Rf sur la génération d'AscOOH.

4.1.7. Stabilité et caractérisation de l'ascorbylperoxyde

La stabilité de l'AscOOH dans un système générateur 2% équiv. MV, sur 167 jours, est illustrée à la Figure 38. Considérant ce résultat, nous avons intérêt à doser l'AscOOH le plus rapidement possible pour éviter des variations dues à la dégradation.

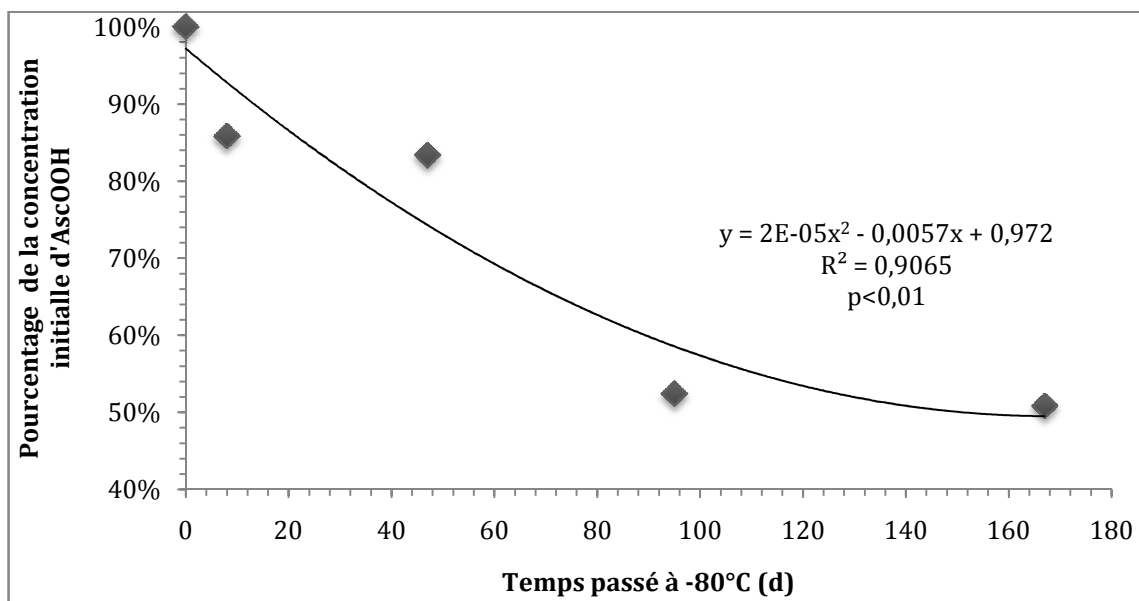


FIGURE 38. Stabilité de l'AscOOH sur 167 jours à -80°C.

Concernant les expériences sur la caractérisation chimique de l'AscOOH, mes résultats n'ont pas permis de confirmer sa structure (peroxydée) hors de tout doute. Par exemple, l'ajout de triphénylphosphine (TPP) à un système générateur 2% équiv. MV n'a pas diminué significativement la concentration en AscOOH (différence moyenne non significative entre - TPP et + TPP de $11,78\mu\text{M}$ équiv. OTC $\pm 5,56$ pour des concentrations d'une centaine de μM). Également, on peut déduire qualitativement que l'AscOOH n'a pas formé d'adduit avec le GSH par l'action de la GST. Toutefois, l'ajout de métabisulfite de sodium à un système générateur 2% équiv. MV a eu tendance à diminuer (non significativement) la concentration en AscOOH (Figure 39), indiquant une possible réaction entre le peroxyde ou les cétones avec le métabisulfite. Malheureusement, les scans n'ont pas permis de détecter les m/z attendues d'adduits cétone - HSO_3^- et d'une fonction peroxydée réduite.

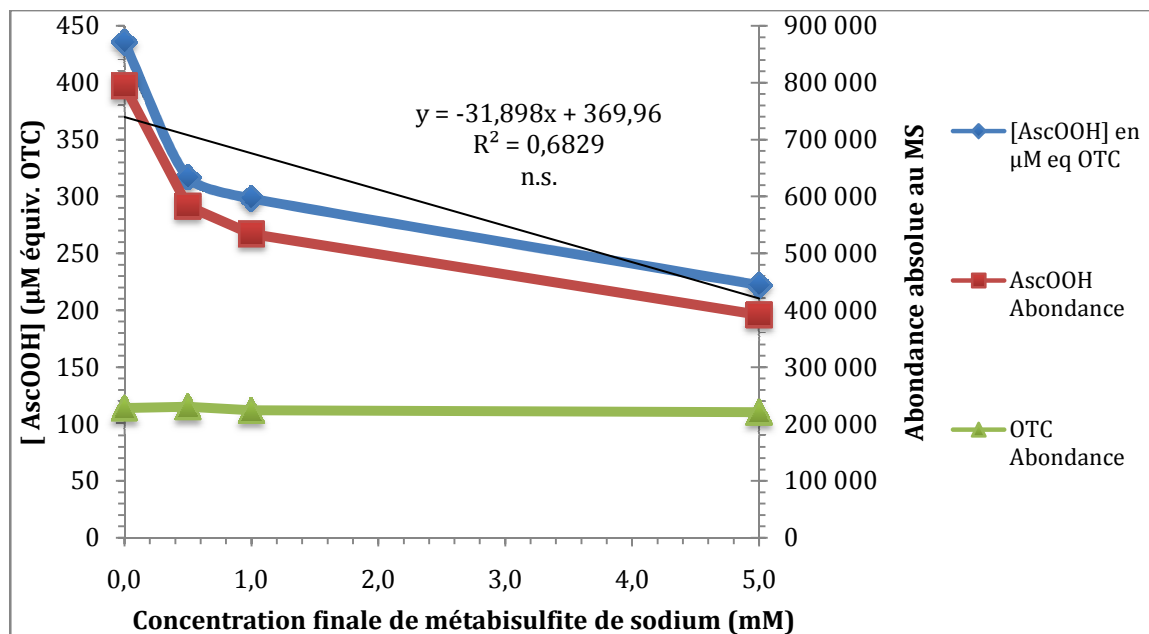


FIGURE 39. Effet de l'ajout de métabisulfite de sodium sur l'AscOOH d'un système générateur, sans ajustement du pH pour l'incubation.

Pourtant, l'ajout d'un excès de NaBH_4 sur l'AscOOH d'un système générateur concentré (80% équiv. MV) a peut-être permis de confirmer ses fonctions chimiques cétones et peroxyde. On se souviendra que le NaBH_4 réduit les fonctions cétones (ajoute 2 H^+ , donc 2 unités de masse sur LC-MS), et enlève 16 unités de masse aux peroxydes par l'élimination d'un atome d'oxygène. L'AscOOH (de masse moléculaire 208) contient, selon le modèle, deux cétones et un hydroperoxyde. Après l'incubation avec du NaBH_4 , on devrait donc retrouver une molécule de masse 196 (m/z 195 : $207 - 16 + 2 \times 2$). Or, le DKG, avec ses deux cétones, mais pas de peroxyde, mène aussi à la génération d'une molécule de masse 196 (m/z 195). On remarque bel et bien une disparition des ions aux m/z 191 et 207 et une apparition d'un ion m/z 195, mais on ne connaît pas la contribution de chacun. Également, on ne retrouve pas de signal à la m/z 211 suggérant que l'AscOOH n'est pas le THDH à deux cétones de Deutsch [76]. Bref, l'analyse est laborieuse, mais voici tout de même les résultats des scans des injections directes, illustrés à la Figure 40. On peut penser que l'ajout massif d'ions sodium par le NaBH_4 provoque une perte de signal général sur le LC-MS.

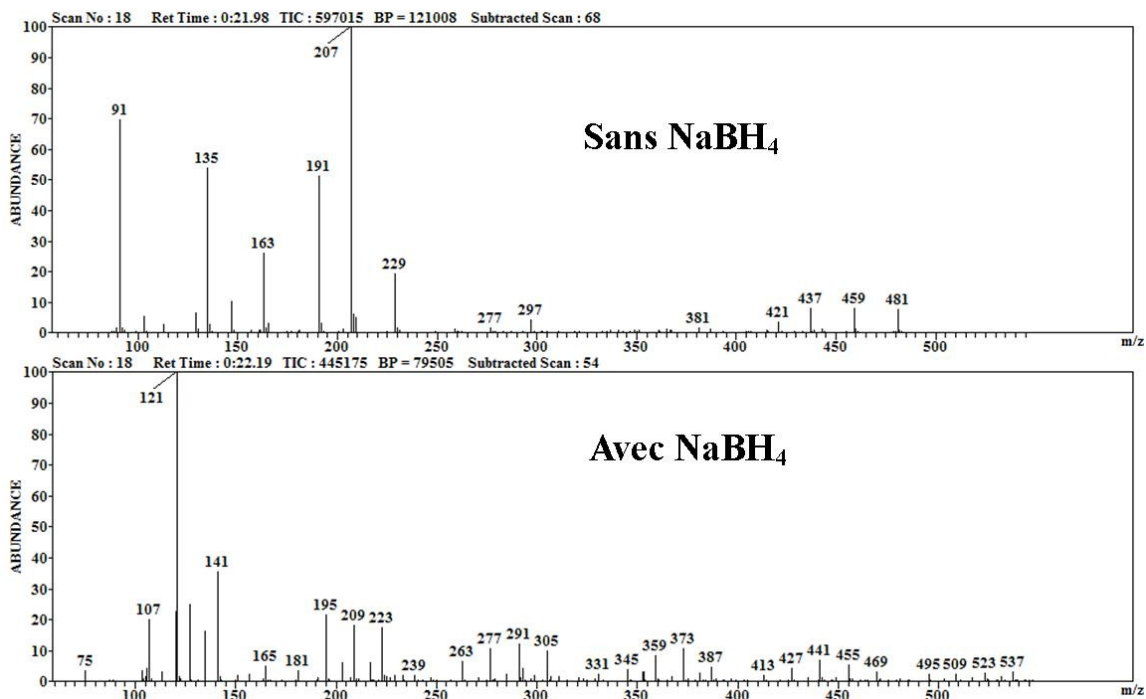


FIGURE 40. Effet du NaBH_4 sur l'AscOOH (Sans NaBH_4 : 500 μL syst. gén. + 360 μL eau basique (NaOH) + ré-acidification à l'acide formique 0,1% ; Avec NaBH_4 : 500 μL syst. gén. + 360 μL NaBH_4 dissous dans NaOH + ré-acidification à l'acide formique 0,1%).

4.1.8. Traitement des échantillons

D'abord, la filtration des systèmes générateurs n'influçait pas la réponse de la mesure de l'AscOOH en MS (non filtré vs filtré : 910 826 \pm 15 031 vs 921 709 \pm 27 156 d'abondance absolue, non significatif). La filtration peut donc être utilisée pour purifier les solutions de systèmes générateurs, bien que ce ne soit pas nécessaire si l'on s'assure de l'absence de dépôts ou de suspensions visibles : les systèmes générateurs préparés dans l'eau HPLC sont assez purs.

De plus, à deux occasions, il fut constaté qu'un échantillon d'urine laissé à température pièce, à cause de la vitamine C endogène qu'elle contient, était un milieu favorable à la génération d'AscOOH post-excrétion (Figure 41). Comme on sait qu'un milieu plus acide inhibe la réaction, 0,1% (v/v) d'acide formique fut ajouté à l'urine dans l'espoir d'empêcher la formation d'AscOOH. L'ajout d'acide abaisse le pH aux environs de 2,5 – 3. Pourtant, malgré une tendance (non significative), l'acide n'a pas prévenu la formation d'AscOOH. D'ailleurs, j'ai expérimenté l'effet de l'acidification à l'acide formique (concentration finale 0,1% v/v) sur la détection de l'AscOOH par MS. L'ajout d'acide à un système générateur semble diminuer la variation de la machine, i.e. des SEM sont globalement diminués de plus de la moitié, mais ce traitement diminue aussi les concentrations d'AscOOH dosées

($p < 0,05$). L'ajout d'acide à l'urine, autant pour la déprotéinisation que pour la conservation, est donc à oublier.

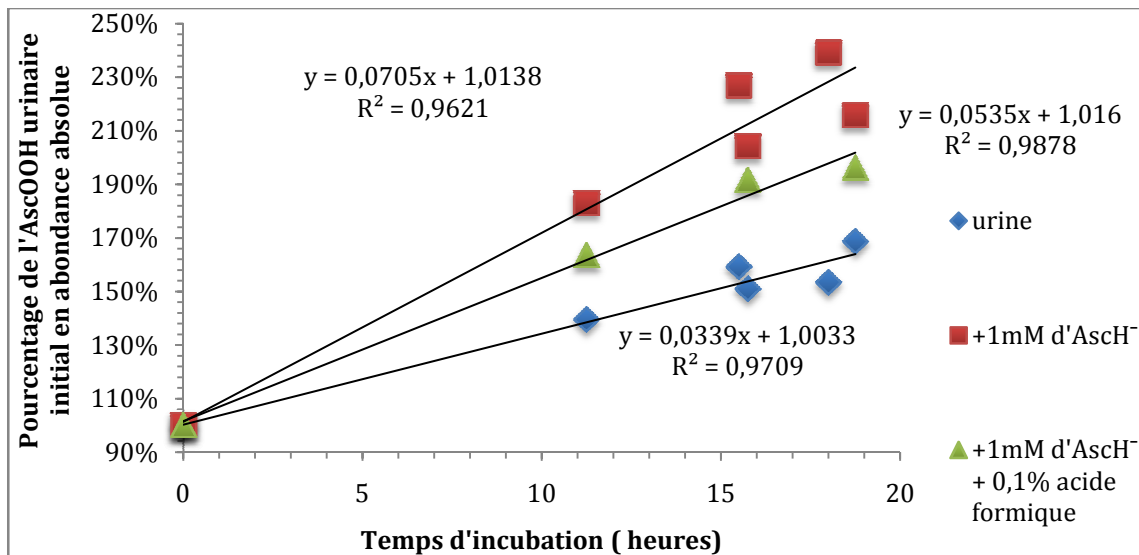


FIGURE 41. Formation d'AscOOH urinaire post-excrétion dû à l'AscH⁻ présent.

Maintenant, on se souvient du volet du papier buvard qui permettait théoriquement de récolter les urines d'enfants prématurés en clinique afin d'y doser l'AscOOH. D'abord, j'ai testé un mélange 50%-50% d'urine et d'un système générateur 2% équiv. MV photo-exposé. La créatinine et l'AscOOH y étaient dosés avant de mettre sur papier Whatman #1. Je procédais au même dosage après l'élution, avec de l'eau nano pure, du volume préalablement séché sur buvard. Dans ces conditions, l'AscOOH urinaire rapporté à la créatinine (nmol équiv. OTC/mg créatinine) n'était pas différent \pm buvard ($13,4 \pm 0,12$ vs $13,3 \pm 0,21$, non significatif). Or, pour s'assurer de la validité du dosage à différentes combinaisons de concentrations en créatinine et en AscOOH, 4 groupes de solutions expérimentales « extrêmes » furent préparées : ❶ concentration \uparrow en créatinine (250mg/dL) et \uparrow en AscOOH (750 μ M); ❷ concentration \uparrow en créatinine (250mg/dL) et \downarrow en AscOOH (25 μ M); ❸ concentration \downarrow en créatinine (30mg/dL) et \uparrow en AscOOH (750 μ M); ❹ concentration \downarrow en créatinine (30mg/dL) et \downarrow en AscOOH (25 μ M). Cette fois, les valeurs d'AscOOH rapportées à la créatinine étaient affectées par le passage sur buvard : ❶ seulement $0,44 \pm 0,03\%$ de la valeur initiale était retrouvé après buvardage ($p < 0,05$), ❷ $10,66 \pm 0,86\%$ de la valeur initiale ($p < 0,05$), ❸ $57,07 \pm 4,75\%$ de la valeur initiale ($p < 0,05$), et ❹ $114,34 \pm 7,05\%$ de la valeur initiale. La différence du 4^e groupe n'était pas significative. Donc, bien que l'efficacité de l'élution semble différer pour la créatinine et l'AscOOH à des valeurs plus extrêmes, l'utilisation des buvards pour des conditions

retrouvées dans la pratique courante est possible (avec des valeurs de créatinine entre 10 et 50mg/dL, et d'AscOOH urinaire sous les 25 μ M équiv. OTC). Pour faciliter la manipulation, l'utilisation de tampons de ouate laissés dans la couche du nouveau-né est aussi envisageable, car la ouate n'affecte pas le dosage de l'AscOOH par LC-MS (différence non significative entre témoin et passage sur ouate : 492,8 \pm 7,5 μ M équiv. OTC vs 532,0 \pm 23,7 μ M équiv. OTC d'AscOOH). Toutefois, il reste à déterminer si la ouate retient significativement la créatinine aux concentrations physiologiques.

4.2. Protocoles expérimentaux *in vivo*

4.2.1. Quantification de l'ascorbylperoxyde dans l'urine d'enfants nés prématurément sous HAIV \pm lumière

Pour mettre la théorie en pratique, on a vérifié si l'AscOOH, dont nos modèles *in vitro* prédisent la présence dans l'HAIV clinique, était retrouvé dans l'urine de patients sous HAIV. La Figure 42 montre que l'AscOOH est retrouvé dans l'urine d'enfants prématurés sous HAIV. Ici, on peut constater l'effet de la protection de la lumière de ces solutions sur l'AscOOH urinaire. Cette différence n'atteint toutefois pas le seuil de signification fixé. Cette étude préliminaire prometteuse a permis de renforcer les résultats de notre modèle animal, présentés ci-après.

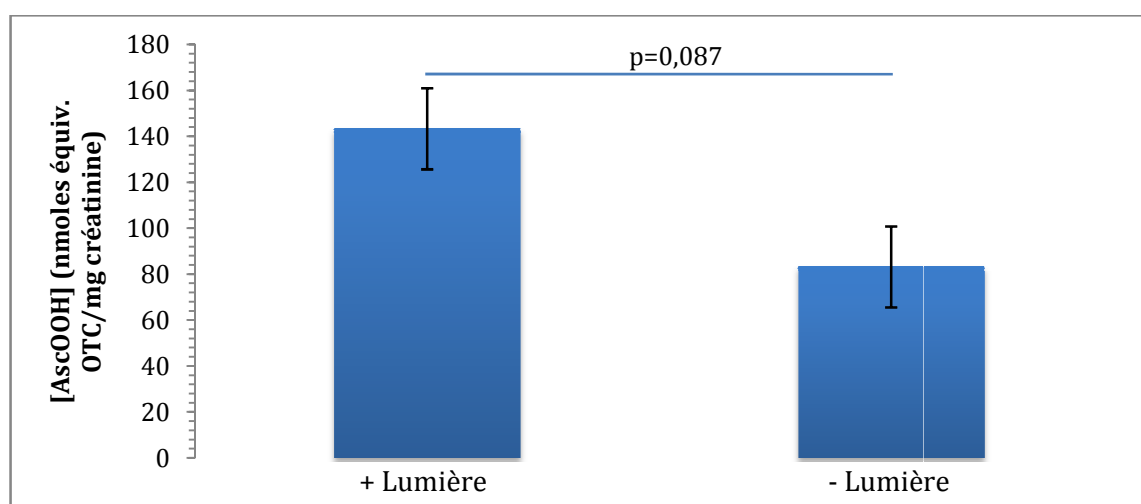


FIGURE 42. AscOOH urinaire chez des enfants nouveau-nés sous HAIV \pm lumière.

4.2.2. Quantification de l'ascorbylperoxyde dans l'urine de cochons d'Inde néonataux sous HAIV ± lumière

On se souvient que des groupes d'animaux avaient reçus, en plus de la solution minimale de dextrose, soit de l'AscH⁻+Rf ou alors la préparation commerciale de MV, à raison de 0, 1 ou 2 % v/v ou équiv. MV. Ces solutions, comme en clinique, étaient exposées à la lumière ambiante lors de l'infusion. Voici les résultats des mesures de concentrations de l'AscOOH retrouvé dans les urines de ces animaux. Ici, à cause de l'inégalité des variances entre groupes, les données d'AscOOH urinaire (en nmol/mg créatinine) ont été transformées mathématiquement en faisant la racine carrée pour le calcul des tests statistiques. La Figure 43 montre que l'AscOOH augmente significativement avec la concentration en AscH⁻ et Rf, mais le fait que l'HAIV contienne toutes les vitamines ou seulement l'AscH⁻ et la Rf ne fait pas de différence. Les interactions n'étaient pas significatives.

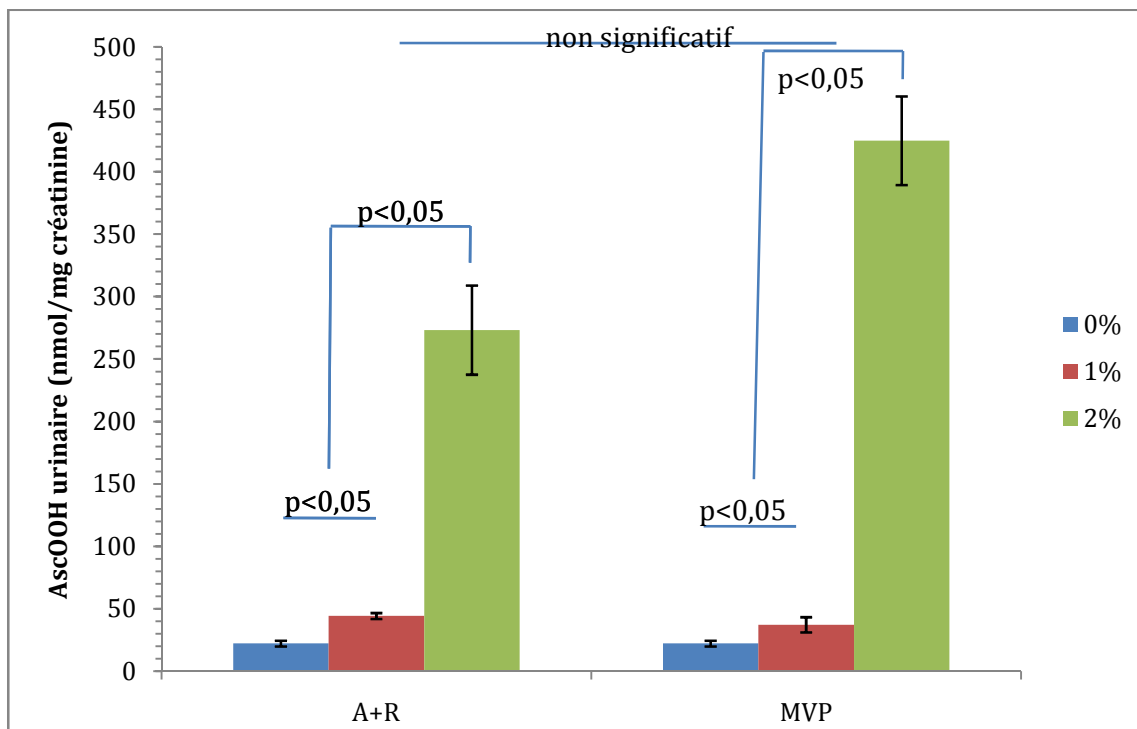


FIGURE 43. AscOOH urinaire chez des animaux sous HAIV +lumière.

Le niveau de base d'AscOOH à 0%, relativement élevé, peut être expliqué par une photo-oxydation de l'AscH⁻ présent dans l'urine des cochons d'Inde. Malgré le fait qu'ils ne reçoivent pas d'AscH⁻, le stock gestationnel de vitamine C n'est pas déplété pour autant. Il est aussi à noter que dans ce groupe d'animaux, ni les TG, ni le CHOL plasmatiques et hépatiques ne corrélaient avec l'AscOOH urinaire. Il faut mentionner que ces urines avaient

passé deux ans au congélateur -20°C et avaient donc subi de la dégradation, favorisant la variation.

4.2.3. Effet de l'infusion d'AscOOH chez le cochon d'Inde néonatal

Dans le cadre de mon projet, un groupe d'animaux (n=11) a été utilisé pour effectuer une courbe dose-réponse de l'AscOOH sur plusieurs paramètres métaboliques et redox. Les solutions consistaient, tel que décrit précédemment, en du dextrose, du NaCl, de l'héparine et une concentration d'AscOOH parmi 0 – 8% équiv. MV.

D'emblée, la méthode d'administration de la solution nutritive comporte une certaine erreur due notamment aux pousse-seringues qui bloquent parfois, aux imprécisions dans la préparation des solutions et des systèmes générateur, mais surtout à l'ajustement constant du débit en fonction de la capacité individuelle des animaux à absorber le fluide. La concentration urinaire d'AscOOH sera donc utilisée comme variable explicative pour les corrélations, étant donné que l'excrétion urinaire de l'AscOOH est directement reliée à la concentration reçue (Figure 44).

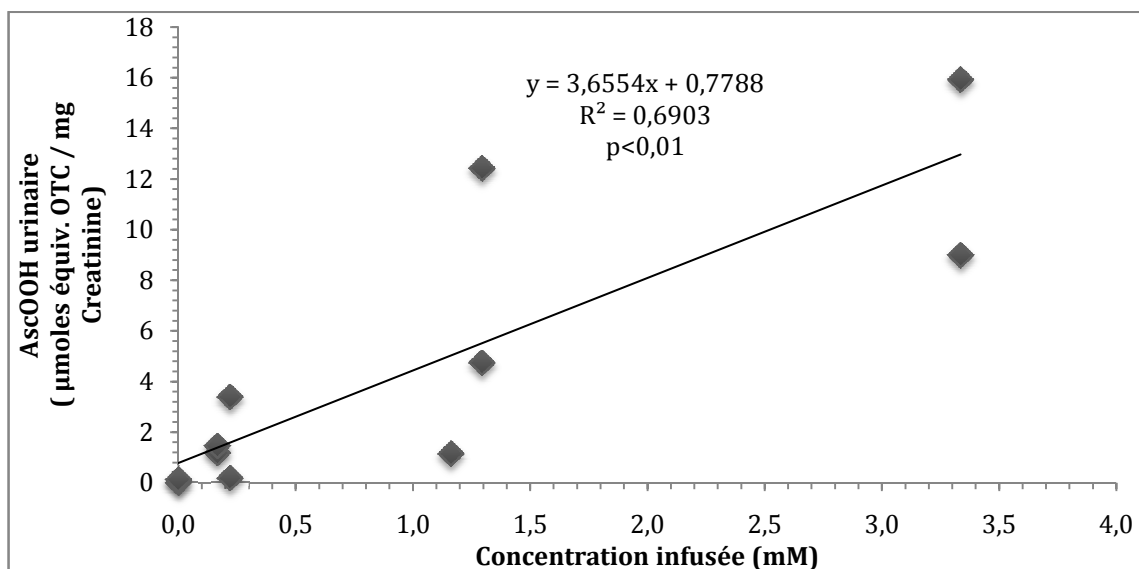


FIGURE 44. Concentration urinaire d'AscOOH en fonction de la concentration infusée.

D'abord, parmi les corrélations intéressantes observées, on retrouve l'effet de l'AscOOH sur la triglycéridémie. Il semble biphasique : selon le modèle mathématique, il y a légère augmentation à faible dose, pour ensuite chuter à haute dose (Figure 45). On peut dès lors se demander si l'AscOOH a un effet toxique à haute dose.

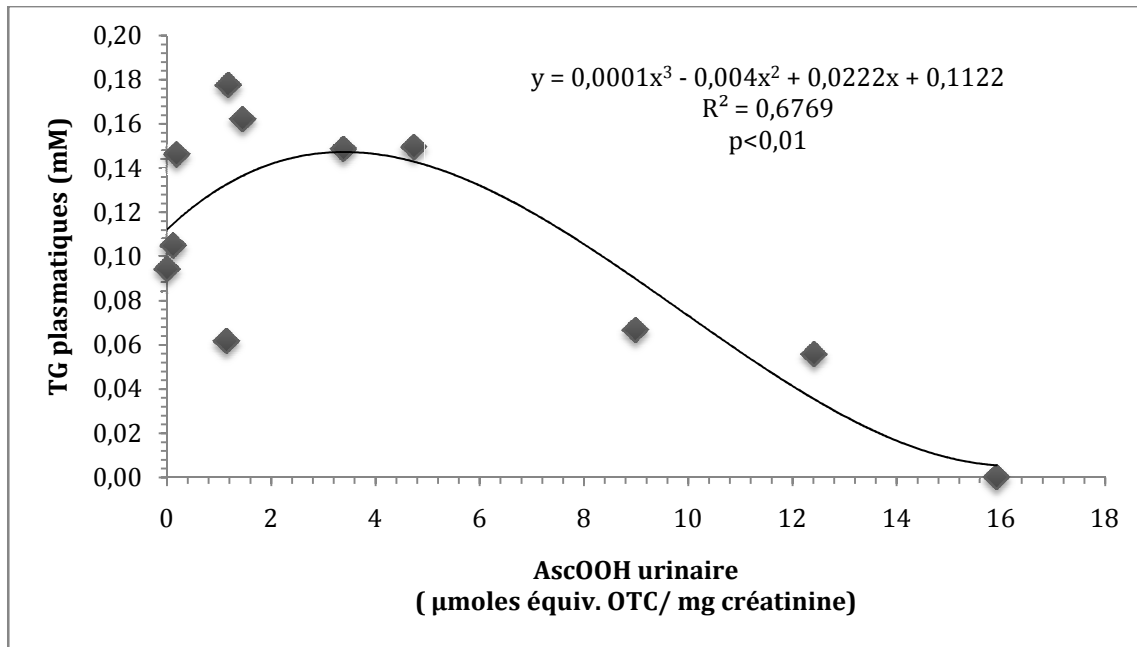


FIGURE 45. Triglycéridémie en fonction de l'AscOOH urinaire.

La courbe du CHOL plasmatique est similaire à celle de la triglycéridémie (Figure 46), suggérant que l'effet de l'AscOOH sur les lipides circulants est au niveau de la libération hépatique ou davantage en amont dans le métabolisme énergétique hépatique. Par contre, les TG et le CHOL hépatiques ne corrélaient pas avec l'AscOOH urinaire.

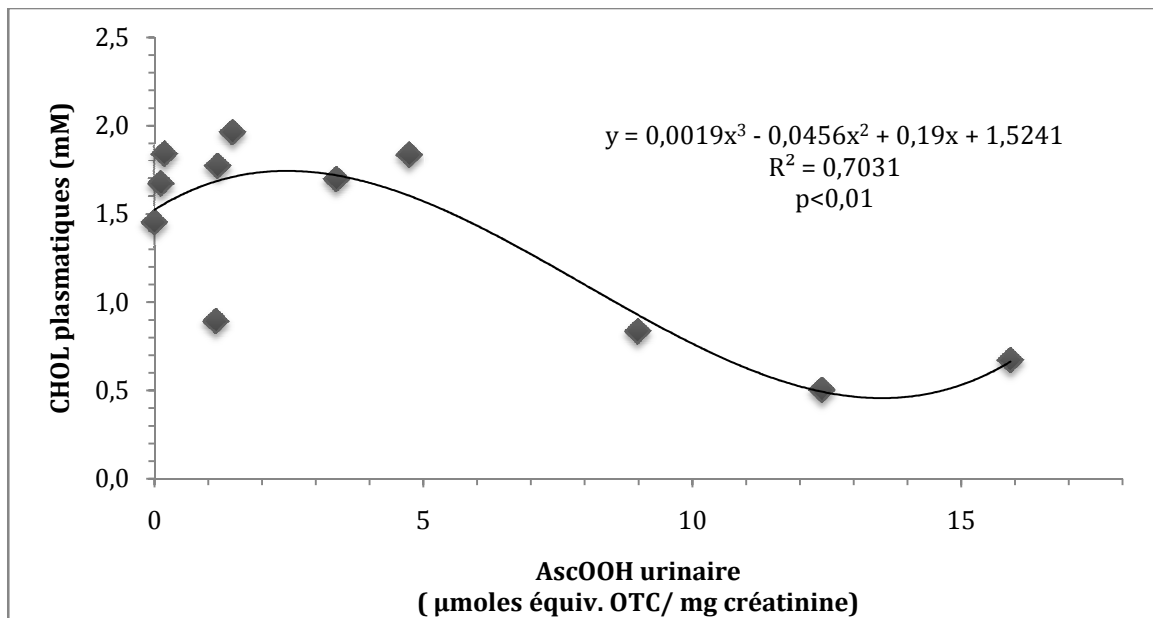


FIGURE 46. Cholestérol plasmatique en fonction de l'AscOOH urinaire.

Le pyruvate est un produit de la glycolyse et substrat de plusieurs voies métaboliques dont la lipogénèse. La relation pyruvate hépatique - AscOOH urinaire suit la même

tendance que les lipides circulants, proposant que l'effet de l'AscOOH soit encore plus en amont dans les cascades métaboliques hépatiques (voir Figure 15, page 36).

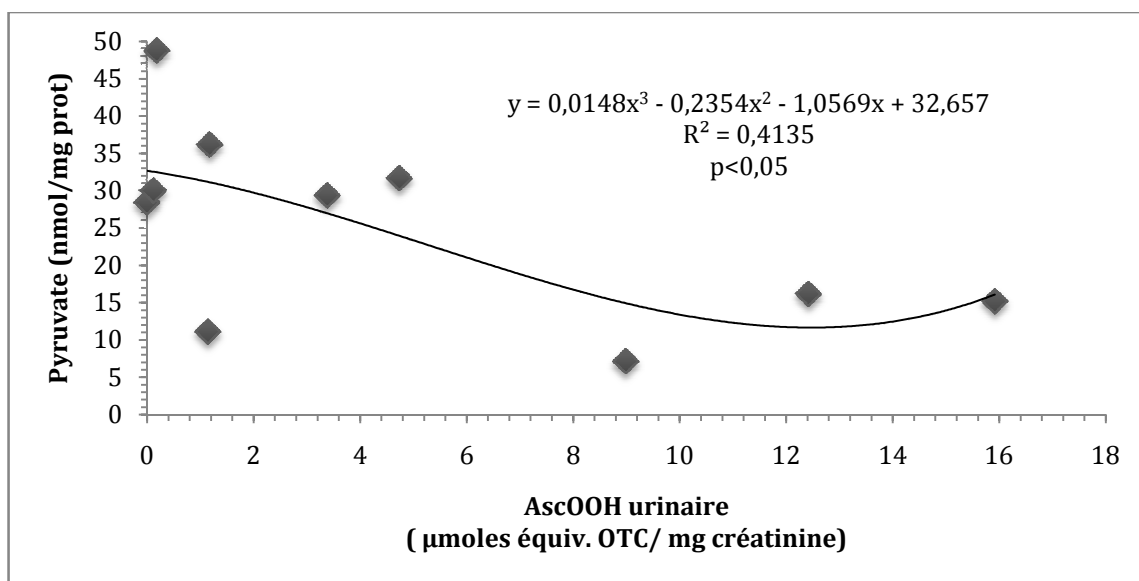


FIGURE 47. Pyruvate hépatique en fonction de l'AscOOH urinaire.

La glycémie, mesurée lors du sacrifice, sans suivre la courbe biphasique observée précédemment, a tendance à augmenter en fonction de l'AscOOH urinaire (Figure 48), suggérant une interaction de l'AscOOH avec la capture du glucose par les cellules. Du moins, une partie de l'effet de l'AscOOH peut être au niveau de la capture du glucose et une autre au niveau intracellulaire, ou en aval de l'entrée du glucose, mais en amont du pyruvate (Figure 15, page 36). Toutefois, ni le glucose, ni le glycogène ou encore le G6P n'ont corrélé avec l'AscOOH urinaire.

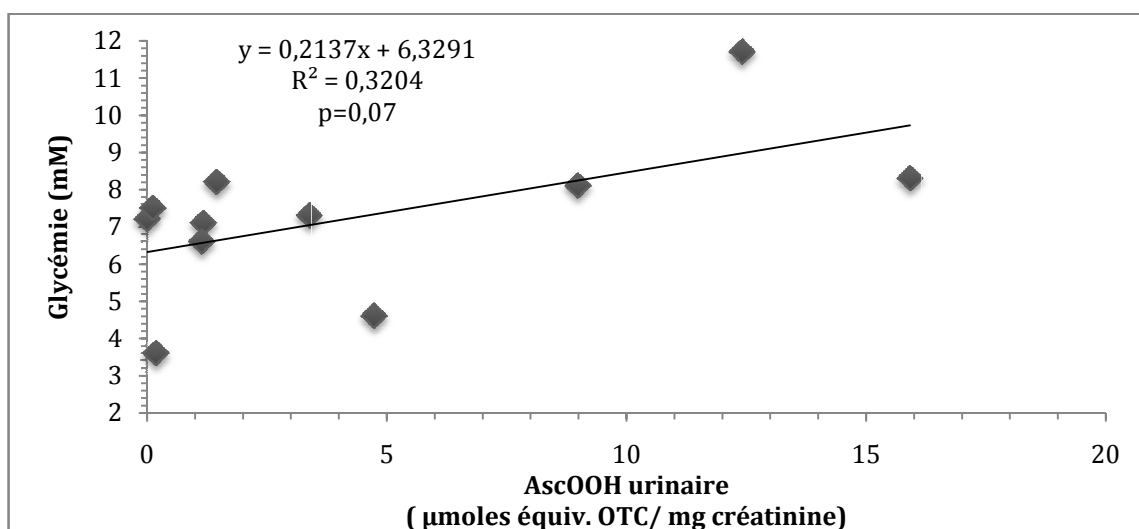


FIGURE 48. Glycémie en fonction de l'AscOOH urinaire.

Quant aux statuts redox tissulaires, la variation du potentiel redox hépatique n'est pas expliquée par l'AscOOH urinaire (Figure 49). On ne retrouve pas non plus de corrélation de l'AscOOH urinaire avec le potentiel redox pulmonaire. Par contre, l'AscOOH urinaire corrèle significativement avec les potentiels redox érythrocytaire (Figure 50) et sanguin (Figure 51).

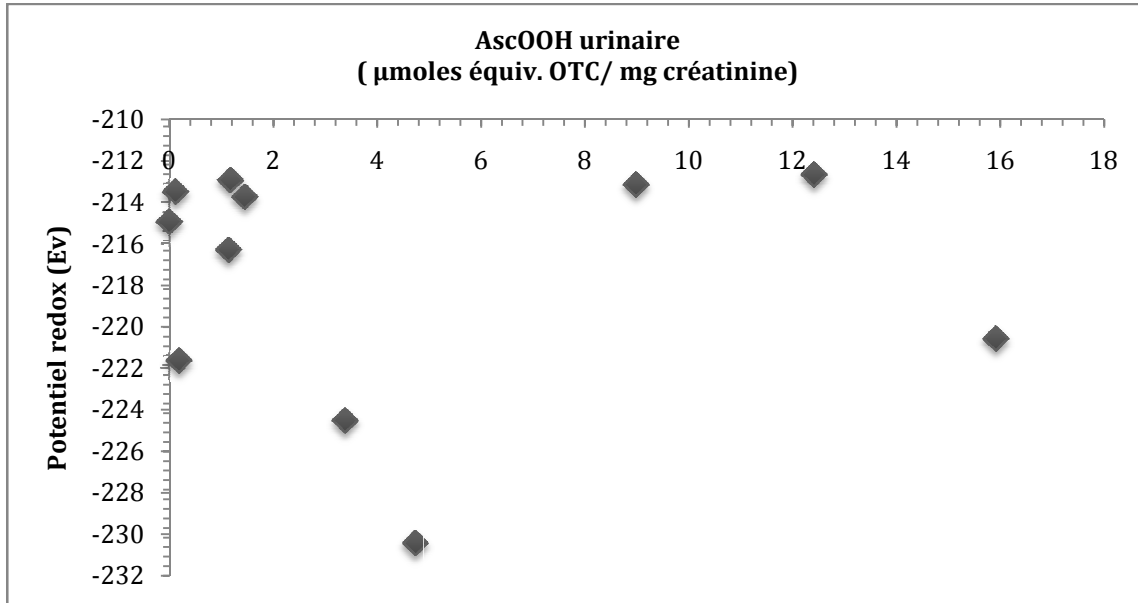


FIGURE 49. Potentiel redox hépatique en fonction de l'AscOOH urinaire.

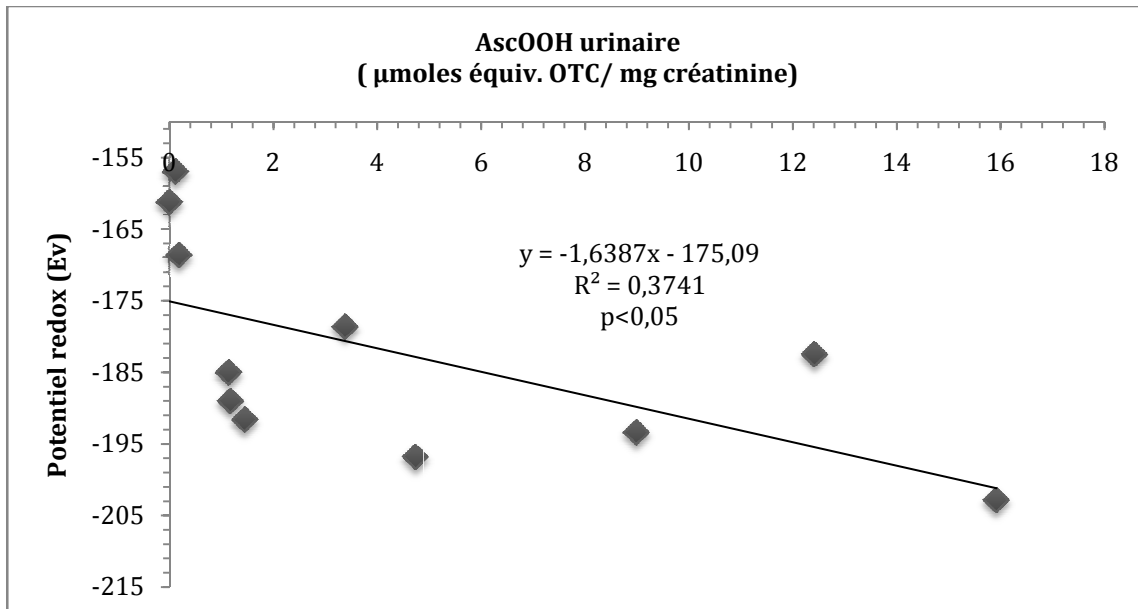


FIGURE 50. Potentiel redox érythrocytaire en fonction de l'AscOOH urinaire.

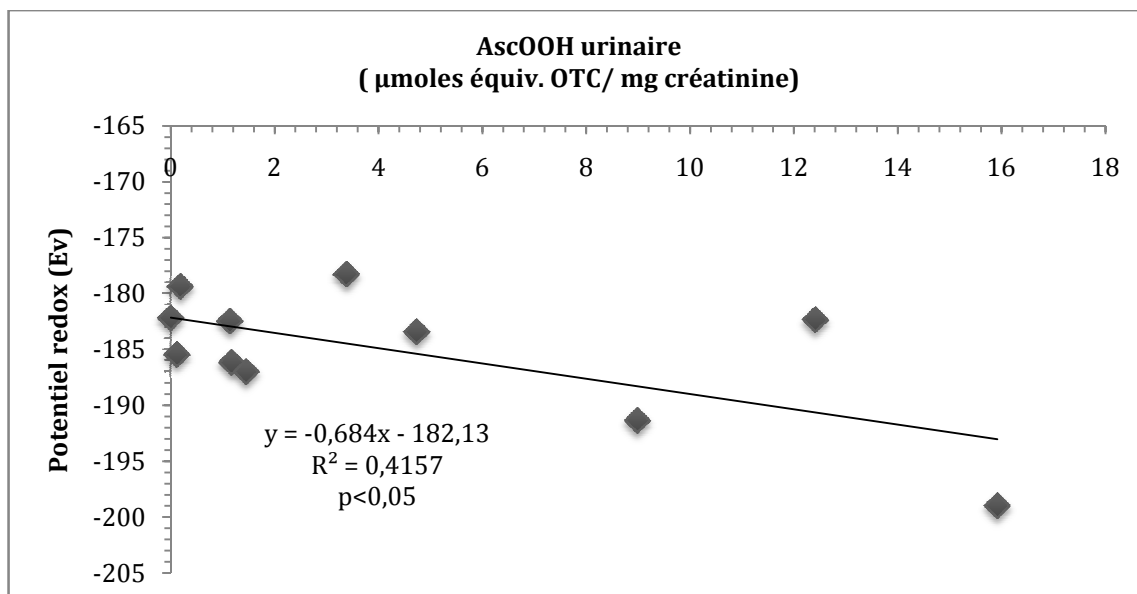


FIGURE 51. Potentiel redox sanguin en fonction de l'AscOOH urinaire.

Le potentiel redox érythrocytaire plus réduit avec la concentration d'AscOOH infusée est influencé par une augmentation de la quantité absolue de glutathion érythrocytaire et un pourcentage décroissant de glutathion oxydé, tel que présenté dans le Tableau 1.

TABLEAU 1. Glutathion total (oxydé et réduit) et le pourcentage de l'oxydé sur le total pour chaque tissu analysé en fonction de la concentration du syst. gén. infusé à l'animal.

% équiv. MV approx. d'AscOOH reçu par l'animal	SANG TOTAL		ÉRYTHROCYTE		POUMON		FOIE	
	Glutathion total	% de GSSG	Glutathion total	% de GSSG	Glutathion total	% de GSSG	Glutathion total	% de GSSG
	nmol/mg prot	%	nmol/mg prot	%	nmol/mg prot	%	nmol/mg prot	%
0,0	1,12	4,6	0,95	19,8	16,7	3,3	25,2	3,3
0,0	1,88	6,2	1,08	28,6	19,7	4,0	22,3	2,9
0,5	1,81	5,7	1,93	5,8	n/d	n/d	17,5	2,4
0,5	1,87	5,4	1,81	4,3	28,5	3,1	18,0	2,2
1,0	1,30	8,6	1,33	17,6	22,1	3,2	21,6	3,4
1,0	1,31	8,4	1,84	13,2	16,9	2,4	31,8	2,7
2,0	1,39	5,4	1,15	5,0	14,7	4,2	20,6	2,0
4,0	1,53	6,4	1,77	9,5	20,1	2,7	13,9	3,4
4,0	1,58	6,4	2,08	4,1	18,1	2,2	18,3	1,3
8,0	2,08	4,8	2,06	4,7	19,0	4,4	17,3	2,4
8,0	2,11	2,7	1,72	2,5	19,7	3,1	29,5	2,1

Il est à noter que l'AscOOH urinaire corrèle avec l'AscOOH dosé dans les échantillons de poumons ($r^2=0,58$; $p < 0,01$), de sang total ($r^2=0,91$; $p < 0,001$) et de globules rouges

($r^2=0,87$; $p<0,001$), mais pas avec l'AscOOH dosé dans le foie, où les valeurs obtenues se situaient souvent sous le seuil de détection fixé.

Pour finir, on se souviendra que l'exposition de l'HAIV à la lumière est soupçonnée contribuer au développement de la dysplasie broncho-pulmonaire, ce qui nous a amené à regarder un peu du côté de cet organe dans le cadre de cette expérience. Pour chaque animal, l'un des poumons fut prélevé, congelé et traité afin d'en faire une coupe histologique. L'alvéolarisation est quantifiée en comptant le nombre d'entrecouplements (les alvéoles) le long d'une ligne droite dans le champ observé en microscopie. Le résultat s'est avéré intéressant : l'indice d'alvéolarisation pulmonaire corrèle significativement avec l'AscOOH urinaire, suggérant un effet délétère de l'AscOOH au poumon (Figure 52). On peut alors spéculer sur la cause de la diminution du nombre d'alvéoles; serait-ce dû à un remodelage, de l'apoptose, ou un développement inhibé ? Des colorations spécifiques des lames auraient pu nous renseigner davantage.

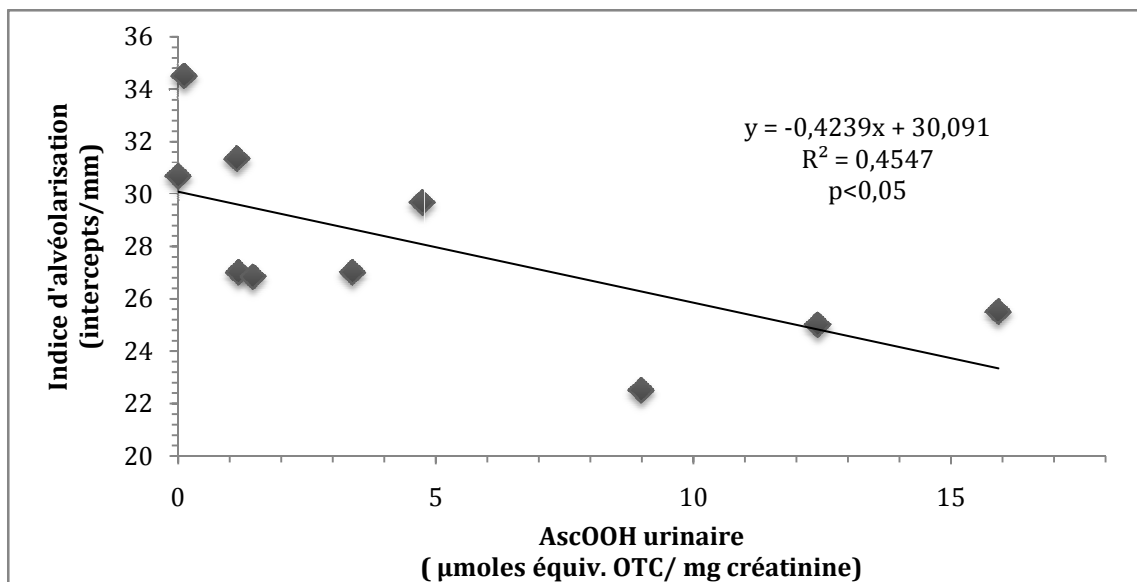


FIGURE 52. Alvéolarisation pulmonaire en fonction de l'AscOOH urinaire.

4.3. Protocole expérimental *in vitro*

4.3.1. Effet de l'incubation d'AscOOH sur la viabilité cellulaire et la concentration en glutathion dans des cellules Caco-2

Avec l'utilisation du modèle épithélial de cellules Caco-2, j'ai pu montrer que l'AscOOH a la faculté d'entrer dans les cellules, et même de traverser un épithélium (Figure 53). En effet,

le fait de retrouver de l'AscOOH dans le milieu basolatéral au prorata de ce qui avait été ajouté en apical en est une démonstration. De plus, l'AscOOH a aussi été dosé dans les lysats cellulaires de façon dose-dépendante, même si on semble observer une saturation à haute concentration sur la figure ci-dessous (Figure 53). L'axe des abscisses (x) de la Figure 53 représente la solution d'incubation de départ (50:50 MEM:système générateur) : la concentration en AscOOH devrait y être la plus élevée. Il faut toutefois mentionner que la concentration en AscOOH de ces solutions fut déterminée plus d'un mois après le dosage des milieux et des lysats de cellules.

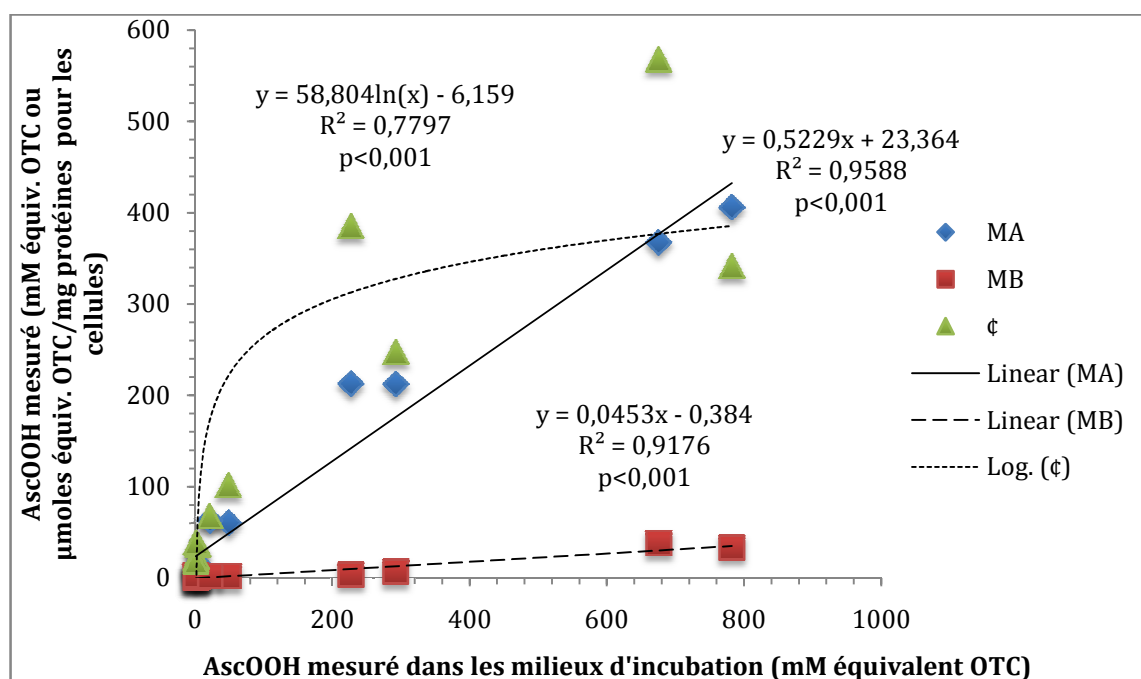


FIGURE 53. AscOOH dosé dans les milieux apicaux et basolatéraux, ainsi que dans les lysats cellulaires, en fonction de l'AscOOH mesuré dans les milieux d'incubation. MA : milieux apicaux. MB : milieux basolatéraux. φ : lysats cellulaires.

Au cours de cette expérience, j'ai aussi pu observer que l'AscOOH semblait interagir avec le statut redox cellulaire. La Figure 54 montre que la quantité totale de glutathion (oxydé + réduit) est influencée par la concentration en AscOOH de manière biphasique. L'effet est expliqué par un modèle polynomial. Toutefois, la quantité totale de glutathion n'est qu'une composante du calcul du statut redox, et n'ayant pas le pourcentage de GSSG, nous ne pouvons que soupçonner l'AscOOH d'interagir directement ou indirectement avec le système glutathion ou sa synthèse. Fait intéressant, la Figure 54 est supportée par un résultat de la section précédente avec le modèle animal. En effet, on remarque une relation biphasique similaire entre le glutathion total érythrocytaire et l'AscOOH urinaire chez l'animal (Figure 55).

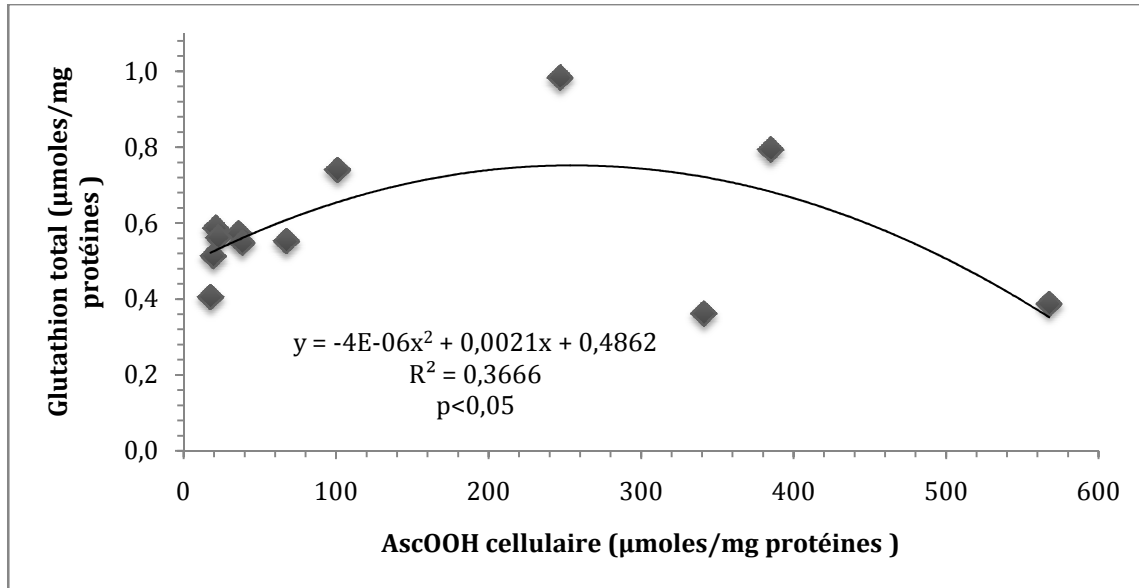


FIGURE 54. Relation entre l'AscOOH cellulaire et le glutathion total du modèle Caco-2.

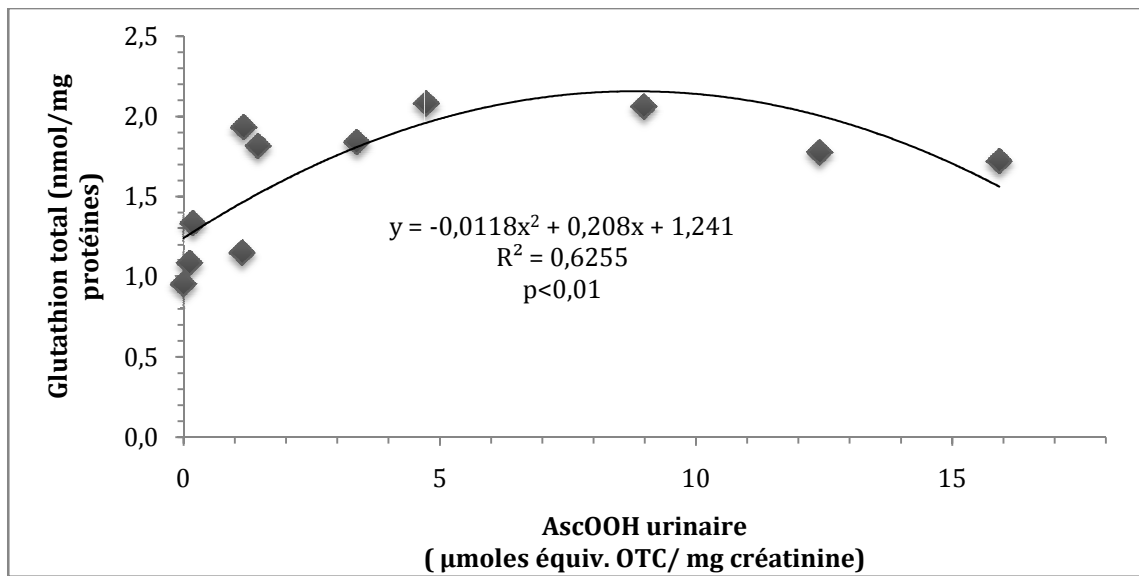


FIGURE 55. Relation entre l'AscOOH urinaire et le glutathion total érythrocytaire du modèle animal.

4.3.2. Effet sur des cellules HepG2 de l'incubation d'AscOOH sur l'entrée du glucose

Dans la section 4.2.3, j'ai montré que la courbe dose-réponse dans notre modèle animal suggérait un effet de l'AscOOH au niveau du transport intracellulaire du glucose. J'ai donc challengé l'entrée du 2-déoxyglucose radioactif en présence d'AscOOH dans des cellules hépatiques HepG2. Ce modèle fut choisi car ce type cellulaire se rapproche du tissu étudié

et pour des raisons pratiques : elles sont utilisables rapidement et il était possible de s'en procurer facilement auprès de collaborateurs.

Ici encore, on retrouve un effet biphasique significativement expliqué par un modèle polynomial, mais cet effet reste faible (Figure 56). Ainsi, l'entrée de glucose à plus haute dose d'AscOOH n'est pas aussi critique qu'on aurait pu le croire. De plus, considérant les variances de chaque point, il reste difficile de conclure quant à un effet clair de l'AscOOH au niveau du transport du glucose.

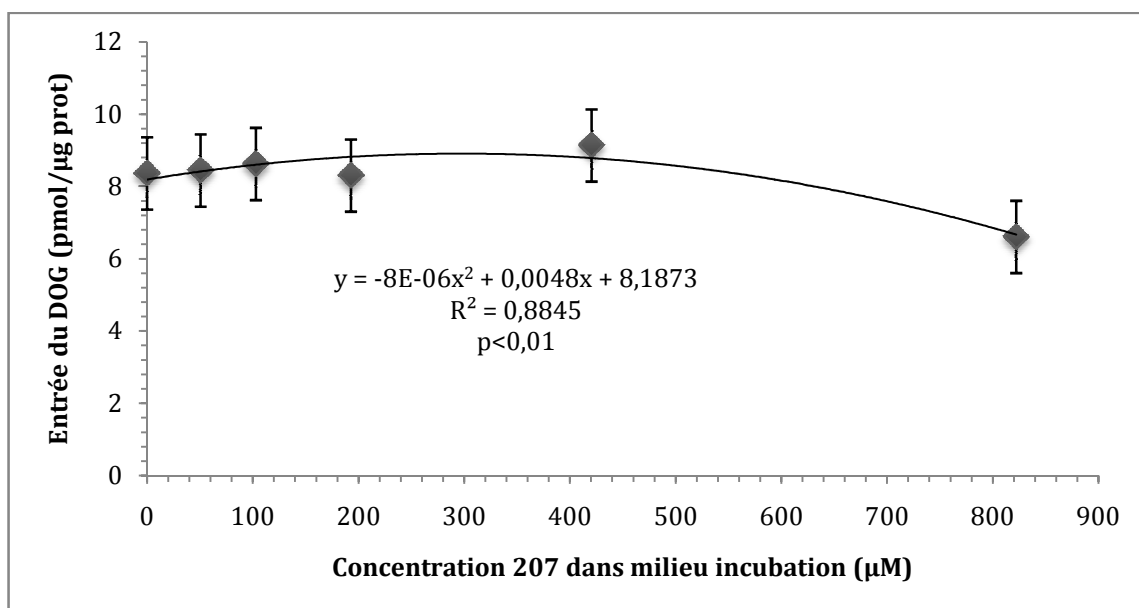


FIGURE 56. Effet de l'AscOOH sur le transport intracellulaire du glucose.

4.3.3. Effet de différents mélanges d'HAIV sur la génération d'AscOOH

Enfin, j'ai vérifié si l'ajout des MV à différentes fractions de l'HAIV génère l'AscOOH de manière similaire. On se souviendra que les trois groupes expérimentaux (MV-Dextrose, MV-AA, et MV-LIP) consistaient en des solutions où les MV (1% v/v) étaient incubées avec du dextrose seul, avec la partie aqueuse de l'HAIV (acides aminés, dextrose, etc.) ou avec l'émulsion lipidique. Ces solutions contenaient respectivement (pour un rappel, voir le schéma à la Figure 17 en page 57) : **(MV-Dextrose)** : MV + dextrose + NaCl + héparine; **(MV-AA)** : ❶ MV + acides aminés + dextrose + héparine; en dérivation avec ❷ lipides + acides aminés + dextrose + héparine; **(MV-LIP)** : ❶ acides aminés + dextrose + héparine ; en dérivation avec ❷ MV + lipides + + dextrose + héparine. Les solutions étaient incubées 3h ± lumière, et ensuite analysées sur le LC-MS individuellement ou mélangées (❶ + ❷,

lorsqu'applicable) pour la quantification de l'AscOOH généré. Ici, à cause des variances inégales entre les groupes, les données d'AscOOH (en μM équiv. OTC) ont été transformées mathématiquement pour l'analyse statistique en faisant la racine carrée. L'effet du mélange de la partie aqueuse ❶ et lipidique ❷ après l'incubation de 3h \pm lumière ne changeait pas significativement la concentration en AscOOH, suggérant que ni les lipides ni les acides aminés ne neutralisaient l'AscOOH déjà formé (test t pairé, $p=0,63$). La Figure 57 présente donc la concentration en AscOOH au temps 0, et après 3h \pm lumière pour les solutions de MV-Dextrose, de MV-AA (❶ seulement) et de MV-LIP (❷ seulement). L'effet temps, ainsi que l'effet lumière sont significatifs. L'ajout des MV aux acides aminés ou aux lipides diminuait significativement la formation d'AscOOH par rapport au mélange MV-Dextrose. La différence entre l'AscOOH formé dans MV-AA et MV-LIP n'est pas significative, même si on observe une tendance. Cette tendance suggère que les acides aminés, et de moindre façon les lipides, préviennent en partie la formation de l'AscOOH dans les solutions d'HAIV. Les interactions n'étaient pas significatives.

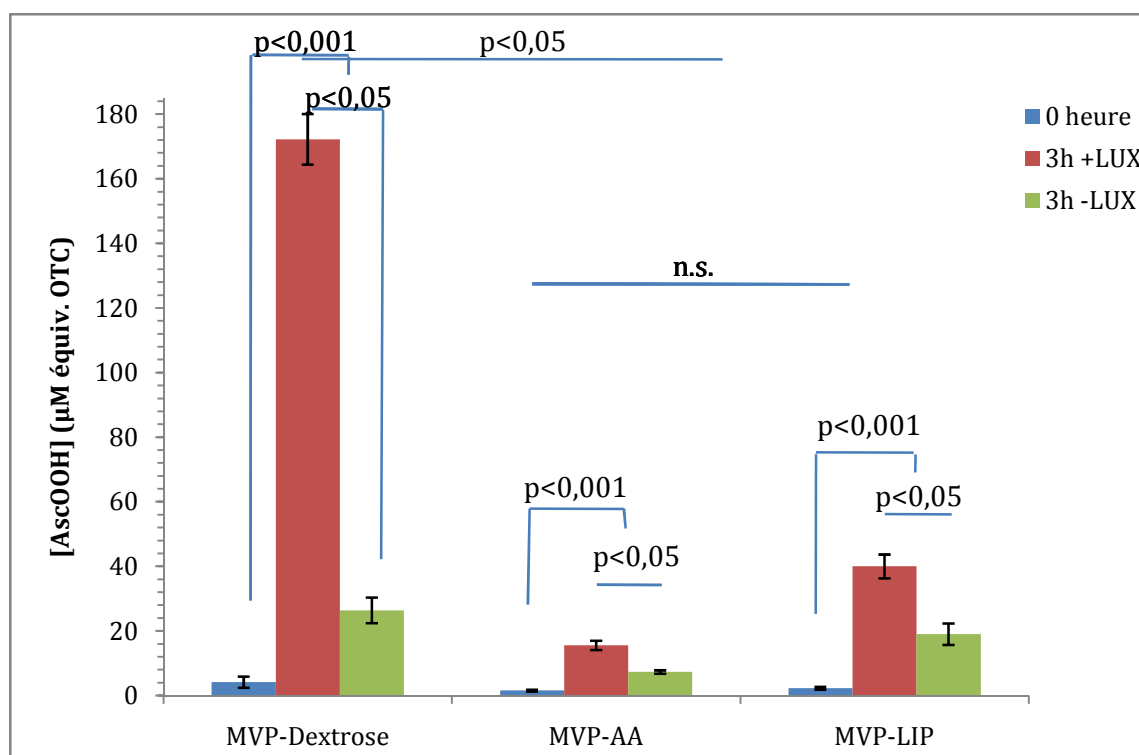


FIGURE 57. Effet de l'ajout des multivitamines à une solution d'HAIV de dextrose, d'acides aminés ou de lipides.

5. Discussion

En premier lieu, il importe de revenir sur la méthode de dosage quantitatif de l'AscOOH par LC-MS pour en rassembler ici ses paramètres. L'injection de l'échantillon se fait à raison de 4 μ l, suivi du nettoyage de l'aiguille avec un mélange 50:50 d'eau et d'ACN. La phase mobile consiste en de l'acétate d'ammonium 10mM et de l'ACN, et passe de 0 à 100% d'ACN en 20 minutes. Un temps « post » de 2 minutes suit afin de retourner à 0% d'ACN et de stabiliser la pression. L'échantillon passe par la colonne C18 indiquée précédemment, et celle-ci est gardée à 20°C. La détection par le MS dure 10 minutes et détecte les m/z suivantes en SIM : 135, 163, 175, 191, 207, 209, 351 (vitamine C et dérivés), ainsi que 146 et 293 (étalon d'OTC). Le voltage de fragmentation, ou d'ionisation, à la source du MS est de 25V. Dans le module de la source, le débit d'azote et la température sont de 12,5l/min et 350°C.

L'utilisation de l'OTC comme standard interne est adéquate bien qu'il faille utiliser les pics du monomère et du dimère. L'OTC ne présente pas d'interaction avec les analytes, et son comportement chromatographique comme en MS est peu influencé par les matrices utilisées dans le cadre de ce projet. Le stock de 2,5mM est conservé au congélateur -80°C et mélangé à l'échantillon à analyser seulement avant l'analyse à raison d'une dilution 5% v/v (concentration finale d'OTC à 125 μ M). Comme il est préférable que la concentration de l'étalon soit proche de celle de l'analyte, cette concentration est un bon compromis puisque les urines contiennent peu d'AscOOH – quelques dizaines de μ M au plus –, et les systèmes générateurs qui en contiennent habituellement plusieurs centaines. Une dilution des systèmes est d'ailleurs recommandée pour doser l'AscOOH autour de 125 μ M équiv. OTC.

Il me faut préciser que cette méthode est fonctionnelle, et fournit des résultats stables et reproductibles. Toutefois, elle n'est pas optimale, étant donné les limites de séparation inhérentes à la colonne qui n'est pas adaptée pour des petites molécules polaires, et à cause des difficultés associées au fait de travailler avec une nouvelle molécule indisponible commercialement (en version originale ou marqué avec des isotopes stables). Avec les molécules commerciales pures, on peut contrôler les concentrations avec lesquelles on veut travailler. C'est donc commode non seulement pour toutes les étapes de la mise au point du dosage (courbes étalons externes, internes, etc.), mais aussi pour les expériences nécessitant une certaine quantité de molécule et où j'ai dû faire des systèmes générateurs. La préparation de ces systèmes est tributaire de manipulations où l'erreur est à risque de

s'accumuler. Quant à la colonne analytique, la prochaine devra être spécifique à l'analyse de petites molécules polaires (p.ex. la *Synergi Polar-RP* de Phenomenex) et pourvue d'une colonne de garde qui la protégera des contaminants (prolongeant ainsi la durée de vie de la colonne analytique).

En poursuivant la lecture de la discussion de mes résultats, vous remarquerez sans doute le peu de références à la littérature, ou encore que les références proviennent tous du laboratoire d'accueil. Ceci s'explique par le fait mes prédécesseurs et moi sommes les seuls au monde à avoir travaillé sur l'AscOOH, d'où l'impossibilité de se comparer.

En ce qui concerne le traitement des échantillons, les systèmes générateurs peuvent être injectés sur le LC-MS comme tels. On peut toutefois s'assurer de leur pureté en filtrant, la filtration n'affectant pas la réponse du LC-MS. Les urines expérimentales doivent être congelées à -80°C le plus rapidement possible après l'excrétion. Une centrifugation de 5 minutes à $7\,200\text{g}$ est toutefois nécessaire préalablement à la congélation. Lors de la décongélation sur glace pour fins d'analyse, une seconde centrifugation est requise. La déprotéinisation acide ou organique n'est pas nécessaire car elle représente une étape supplémentaire qui n'améliore pas significativement le dosage ou qui dilue trop l'échantillon, comme il fut démontré. La filtration des urines est possible pour garantir un nettoyage, même si la centrifugation est assez efficace. D'ailleurs, lors de l'analyse de plusieurs dizaines d'urines, la filtration individuelle post-centrifugation devient une étape laborieuse et coûteuse. Concernant la récolte d'urines de nouveau-nés sur papier buvard, j'ai démontré que l'opération était réalisable dans les conditions avec lesquelles on travaille au laboratoire, i.e. des concentrations basses en AscOOH et en créatinine. En effet, il n'y avait pas de différence significative dans les concentrations mesurées de l'AscOOH rapporté à la créatinine entre l'analyse pré et post-buvard sur le groupe de solutions expérimentales contenant 30mg/dL de créatinine et $25\mu\text{M}$ équiv. OTC d'AscOOH. Rappelons que les buvards étaient des papiers Whatman qualitatifs #1 ronds de $4,25\text{cm}$. Il serait possible de substituer le papier par une ouate de coton imbibée dans la couche pour faciliter l'étape de l'élution qui consistera alors qu'au simple pressage de la ouate. L'AscOOH n'est pas significativement adsorbée sur la ouate, mais il reste à confirmer que la créatinine ne l'est pas non plus. Cette méthode permettra de poursuivre les études des effets de l'AscOOH en clinique, de façon non invasive, et sans occasionner de surcharge de travail pour le personnel soignant.

L'AscOOH généré par les systèmes générateurs est assez instable dans le temps et sa dégradation peut atteindre près de 50% en moins de 6 mois si conservé au congélateur à -80°C. Sa dégradation suit une courbe qui semble décroître exponentiellement. À température pièce, de brèves expériences ont montré que l'AscOOH était encore plus instable : la même courbe passait de 100% au jour 0, à 80% au jour 1, et il ne restait qu'environ 30% de l'AscOOH initial après deux semaines (au jour 15). Ces considérations sont importantes pour le traitement et la conservation des échantillons.

Quant à la confirmation de la structure de l'AscOOH, comme ce n'était pas l'un de mes objectifs, j'ai fait peu de progrès par rapport à mes prédécesseurs, si ce n'est par l'expérience du borhydrure de sodium (NaBH_4). En effet, l'incubation d'un système générateur à pH basique avec le NaBH_4 , et subséquemment ré-acidifié, a fait disparaître la m/z à 207 et fait apparaître un pic à la m/z 195. Ce dernier pic pouvait correspondre à l'AscOOH ayant perdu sa fonction peroxyde (transformée en fonction alcool), et ayant subi la réduction de ses cétones. À partir de la structure proposée, les prochaines expériences devront consister en la synthèse chimique purifiée de l'AscOOH. Ceci permettra de confirmer la structure hors de tout doute.

Concernant la formation de l'AscOOH par les systèmes générateurs, on connaît maintenant un peu mieux les facteurs qui la favorisent. On pense d'abord au pH : un pH autour de la neutralité est optimal, mais dès qu'il descend sous 5, la formation de l'AscOOH devient très inhibée. Ce résultat corrobore l'une des conclusions d'un article de Jung et Kim présentant différents facteurs qui influencent la photo-oxydation de l'AscH⁻ par la Rf photo-excitée [103]. Ils avaient montré que la vitesse de l'oxydation de l'AscH⁻ par l'oxygène singulet chutait quand le pH passait de 7,5 à 4,5. À l'inverse, j'ai déterminé qu'un pH trop basique stimulait la dégradation accélérée de l'AscH⁻ et ne semblait pas favoriser la voie de l'AscOOH, en plus de perturber le dosage par LC-MS.

Parmi les facteurs qui favorisent la génération d'AscOOH par le système générateur, on retrouve aussi l'intensité lumineuse et l'aération (présence d'oxygène dissous). Ce dernier facteur implique un rapport surface/volume élevé, une agitation magnétique et un apport en air. Pour le rôle de l'oxygène, je confirme les résultats de Laborie *et al.* qui avaient montré que la Rf photo-excitée catalyse le transfert d'électrons entre l'AscH⁻ et l'oxygène, formant du H_2O_2 [27], selon le modèle présenté à la Figure 10 en page 25. Rappelons que le H_2O_2 généré est nécessaire à la formation de l'AscOOH.

La concentration en Rf influence aussi la vitesse de formation de l'AscOOH. Malgré des différences expérimentales, Laborie *et al.* étaient parvenus à une conclusion semblable quant à l'effet de la concentration de Rf sur la génération de peroxydes [27]. Toujours est-il que la vitesse de réaction offerte par une concentration standard de 1,67% de Rf (par rapport à l'AscH⁻) est adéquate pour nos expériences. Pour les systèmes générateurs plus concentrés, il est possible de diminuer le pourcentage de Rf étant donné la relativement faible solubilité de la Rf. Il suffit alors de jouer sur les autres paramètres et de vérifier au LC-MS la complétion de la réaction (au maximum 24 à 48h). Le contrôle des facteurs énumérés permet de préparer une variété de systèmes générateurs spécifiques. Enfin, la quantité d'AscOOH formée au final est bien sûr directement dépendante de la concentration initiale en AscH⁻, et par extension, du % équiv. MV du système ($r^2 = 0,9997$; $p < 0,001$; données présentées en annexe, p.119). Dans l'article de Laborie *et al.*, la génération de peroxydes était aussi directement proportionnelle à la concentration de l'AscH⁻ [27].

Dans l'HAIV, l'ajout de composantes nutritives affecte la génération d'AscOOH. Par exemple, alors qu'un système générateur 1% équiv. MV, avec une composition minimale, génère environ 300 μ M équiv. OTC d'AscOOH (donné par la régression ci-dessus), l'incubation de MV (1% v/v) avec 8,7% (p/v) de dextrose à la lumière en génère « seulement » 172,3 \pm 7,8 μ M équiv. OTC. Il est rapporté que le glucose a effectivement un effet antioxydant [27]. En plus du dextrose, la présence d'une émulsion lipidique (Intralipid®, 1,6% p/v) dans la solution d'HAIV incubée abaisse la concentration d'AscOOH formé à 40,0 \pm 3,7 μ M équiv. OTC. Cet effet inhibiteur des lipides sur la génération d'AscOOH n'a pas son pendant sur la génération de peroxydes dans l'HAIV, tel que montré dans l'article de Laborie *et al.* Les lipides sont plutôt de bons substrats pour la production de peroxydes [27]. En outre, dans mon expérience, si les lipides sont remplacés par un mélange commercial d'acides aminés (Travasol®, 2,0% p/v), la formation de l'AscOOH a tendance à être encore plus inhibée (15,6 \pm 1,4 μ M équiv. OTC). Ici, on peut faire un parallèle avec les résultats de Lavoie *et al.* qui démontraient l'effet inhibiteur des acides aminés sur la génération de peroxydes dans des solutions d'HAIV contenant des MV [6]. Ainsi, le dextrose, les acides aminés, et les lipides entrent probablement en compétition avec l'AscH⁻ car il est connu que ce sont aussi des substrats pour la Rf photo-excitée [101, 110, 201].

Toutefois, l'ajout de lipides à la solution de MV + acides aminés déjà incubée, ou l'inverse, l'ajout d'acides aminés à la solution de MV + lipides déjà incubée, ne diminue pas significativement les niveaux d'AscOOH. Ceci suggère que l'AscOOH formé réagit faiblement avec les acides aminés ou les lipides.

Néanmoins, le fait de savoir que la formation d'AscOOH est inhibée par la présence de certaines composantes permet de recommander des mélanges d'HAIV optimisés pour y réduire la formation de l'AscOOH. Cette molécule est peroxydée, et ces recommandations seront d'autant plus valables si l'on détermine hors de tout doute un rôle biologique nocif, comme il en sera question plus loin. Mais en dehors de l'AscOOH, il reste que le H₂O₂ est l'autre produit généré en quantité par les systèmes photochimiques dans l'HAIV. Juste la présence de cet oxydant rend ces recommandations pertinentes. D'abord, le mélange MV 1% - dextrose seuls devrait être évité car ce système génère près de 200µM équiv. OTC d'AscOOH lorsqu'exposé à la lumière. Aussi, malgré une nouvelle façon de faire qui préconise l'ajout des MV aux lipides [26], l'addition des MV aux acides aminés semble être la façon de diminuer au maximum la production l'AscOOH, et par extension la dégradation de la vitamine C. Toutefois, c'est probablement certains acides aminés qui neutralisent la Rf photo-excitée à la place de l'AscH⁻, générant peut-être des sous-produits oxydés et oxydants de la dégradation d'acides aminés essentiels. Les lipides sont probablement aussi oxydés par la Rf photo-excitée. Ainsi, la façon la plus efficace d'empêcher au maximum la formation de l'AscOOH en clinique est la protection contre la lumière.

Toutes les solutions discutées précédemment sont de nature *in vitro*. Il était donc important de valider le fait que notre modèle animal, et également les bébés prématurés, traités à l'HAIV sont bel et bien exposés à l'AscOOH. Ceci a été réalisé par le dosage de l'AscOOH dans les urines animales et celles de nouveau-nés prématurés provenant d'une unité néonatale. Chez l'animal, j'ai montré que la concentration urinaire d'AscOOH est principalement dépendante de sources exogènes, car elle est associée à la concentration des vitamines de l'HAIV infusées sans protection contre la lumière. L'AscOOH urinaire est aussi un reflet de l'exposition à la lumière ambiante des solutions d'HAIV, comme tendent à montrer les résultats chez le nouveau-né. Nos données suggèrent donc que la détection de l'AscOOH dans les urines serait une façon efficace et non invasive d'évaluer l'efficacité des moyens de photo-protection de l'HAIV utilisés en clinique.

Les données du groupe d'animaux ayant participé à la courbe dose-réponse confirment ces résultats : l'AscOOH dans l'urine est le reflet de la photo-oxydation de la solution de nutrition intraveineuse. En effet, l'AscOOH urinaire corrélait très significativement avec la concentration de l'AscOOH dans la solution expérimentale d'HAIV infusée.

Préalablement à la courbe dose-réponse testée chez les animaux, j'en ai réalisé une sur des cellules Caco-2, un modèle cellulaire d'endothélium. De cette façon, il a été montré que non seulement l'AscOOH pénètre la cellule, mais il peut passer du milieu apical au milieu basolatéral. Toutefois, les concentrations retrouvées en milieu basolatéral par rapport au milieu apical étaient au plus d'environ 20%. Pourtant, l'AscOOH cellulaire est directement proportionnel à l'AscOOH dosé dans le milieu apical (pente de 1,1 ; r^2 de 0,86 ; $p < 0,001$), suggérant qu'un équilibre de l'AscOOH s'est établi de part et d'autre de la membrane apicale. Or, le fait que la relation linéaire de la concentration d'AscOOH dans les milieux basolatéraux en fonction de l'AscOOH d'incubation ne soit pas parallèle avec celle de la concentration d'AscOOH dans les milieux apicaux ou dans les cellules est peut-être le résultat de la spécificité des membranes apicales et basolatérales quant aux protéines de transport dans le modèle Caco-2. En effet, il est soupçonné que le transport de l'AscOOH s'effectue par diffusion facilitée. Même si l'AscOOH est une molécule de faible poids moléculaire, sa fonction acide carboxylique potentiellement dissociée au pH physiologique rendrait l'AscOOH polaire et donc mauvais candidat pour la diffusion simple.

Revenons à l'expérience dose-réponse faite chez les animaux. Parmi les perturbations biologiques en lien avec l'AscOOH observées, on note d'abord les désordres d'ordre métabolique. En effet, l'AscOOH perturbe le métabolisme énergétique suivant une courbe biphasique qui reviendra souvent. Ainsi, à faible dose (AscOOH urinaire bas), il y a augmentation des lipides circulants, alors qu'à doses élevées (AscOOH urinaire dans le haut de la courbe), il y a chute des lipides circulants. Ceci suggère une toxicité de l'AscOOH. Comme les profils des TG et du CHOL plasmatiques sont semblables, on se demande alors si l'effet de l'AscOOH n'est pas en amont, au niveau de la relâche des VLDL par le foie, par exemple, ou encore plus en amont. Pourtant, les niveaux hépatiques de ces lipides ne corrèlent pas avec l'AscOOH urinaire ou infusé. La baisse de la lipidémie en fonction de la concentration d'AscOOH infusée est contraire à la stéatose observée chez nos animaux sous HAIV photo-exposée [37]. Celle-ci peut être associée à H_2O_2 , alors que l'effet de

l'AscOOH est différent. Mais ce résultat n'est peut-être pas surprenant compte tenu qu'il semble que l'AscOOH infusé ne se retrouve pas au niveau du foie (aucune corrélation de l'AscOOH hépatique avec l'AscOOH urinaire, et plusieurs valeurs sous le seuil de détection). D'ailleurs, l'absence d'AscOOH dans le foie peut très bien être le reflet d'une détoxification active.

Les données du pyruvate et de la glycémie corrélaient pourtant significativement avec l'AscOOH urinaire, suggérant que l'apparente toxicité de l'AscOOH s'explique par une insuffisance en substrat en amont des voies métaboliques énergétiques. On peut alors penser à une interférence dans le transport du glucose ou à une inhibition de la glycolyse. Effectivement, la glycémie a tendance à être plus élevée en fonction de l'AscOOH urinaire, mais l'effet n'est pas marqué, ni significatif. J'ai d'ailleurs confirmé dans un modèle cellulaire d'hépatocytes HepG2 que le transport de glucose est seulement faiblement modulé par l'AscOOH. Enfin, chez mes animaux, le dosage de certains métabolites en lien avec la glycolyse (glucose, G6P et glycogène) n'a pas montré d'associations avec l'AscOOH urinaire. Il est vraisemblable que l'AscOOH agisse au niveau d'une enzyme précise de la glycolyse. Or, comment l'AscOOH pourrait agir sur certains intermédiaires de la cascade métabolique sans entrer dans l'hépatocyte, ni déséquilibrer le redox hépatique ?

En effet, l'absence d'effet de l'AscOOH sur le redox hépatique suggère que le redox n'est pas à l'origine de la perturbation énergétique observée. Pourtant, l'AscOOH infusé dans la circulation a significativement perturbé le statut redox érythrocytaire et celui du sang total. Comme les érythrocytes contribuent significativement au pool plasmatique en glutathion [202], il n'est pas étonnant que les deux résultats correspondent. Ainsi, on retrouve un potentiel redox plus réduit en fonction de l'augmentation de l'AscOOH urinaire. La pente est d'ailleurs très marquée dans le globule rouge. Cette chute paradoxale du potentiel redox peut être en partie explicable par une augmentation de la synthèse érythrocytaire de glutathion en réponse à l'oxydation apportée par le peroxyde AscOOH. En effet, la synthèse de glutathion est sensible aux dérèglements redox [203-205].

Malgré toutes ces conclusions, le mécanisme d'action de l'AscOOH reste encore inexpliqué. La littérature fait état que certaines voies de signalisation intracellulaires sont activées par un redox extracellulaire plus réduit dans des modèles cellulaires [206]. Par exemple, il a été rapporté que dans un modèle cellulaire de neurones, un milieu extracellulaire réduit (GSH en millimolaires) provoquait une déplétion énergétique. Ce

phénomène s'expliquait par l'interaction entre le GSH et certains sites redox des récepteurs NMDA, activant ces récepteurs ionotropes normalement activés par le glutamate [207]. Ceci provoquait une entrée d'ions calcium beaucoup trop marquée entraînant éventuellement l'apoptose [122]. Dans notre cas, il serait aussi possible que la réduction du potentiel redox plasmatique déclenche une cascade de signalisation ayant pour effet la régulation à la baisse de l'activité d'enzymes glycolytiques. Comme plusieurs protéines participant à la signalisation cellulaire sont présentes à la surface des cellules et sont redox-sensibles grâce à leur résidus cystéines et méthionines [207], il est aussi possible que l'AscOOH plasmatique déclenche lui-même des cascades de signalisation au niveau des hépatocytes. L'effet de l'AscOOH au foie serait donc potentiellement indirect. On pourrait supposer que l'AscOOH réagit avec des résidus sérines – ces résidus phosphorylables souvent impliqués dans la signalisation [150]– de protéines membranaires. Mais comme l'AscOOH est excrété de façon substantielle dans l'urine, sa réactivité semble tout de même limitée.

On arrive donc à la conclusion que l'AscOOH perturbe le métabolisme énergétique hépatique, mais d'une façon encore mal comprise. Beaucoup de travail reste à faire pour déterminer avec précision un mécanisme d'action de l'AscOOH, et pourquoi l'effet de l'AscOOH est souvent biphasique.

Pour finir, il importe d'apporter des nuances à mes résultats de la courbe dose-réponse chez l'animal. En effet, étant donné que le NH_4OH sert à ajuster le pH dans les systèmes générateurs utilisés pour l'expérience, c'est la seule autre molécule dont la concentration (3,3 – 13,2mM) est croissante et fonction de l'AscOOH (ou plutôt de l'AscH⁻ de départ) qui est infusée aux animaux. Comme l'excès d'ions NH_4^+ circulants est transformé en urée au foie avec consommation d'ATP [150], il reste possible qu'une partie des effets biologiques observés dans le cadre de cette expérience, du moins au foie, soit due aux ions ammonium. En excès, NH_4^+ cause de la neurotoxicité, mais rien n'indiquait que mon groupe d'animaux souffrait de cette pathologie. Toutefois, des expériences supplémentaires seront menées pour s'assurer de l'innocuité de l'hydroxyde d'ammonium dans la gamme de concentrations utilisées. Également, il n'est pas à exclure un effet de d'autres molécules générées dans les systèmes générateurs incubés et infusés aux animaux. Malgré une courte durée de vie, on peut penser au DHA. On l'a dit précédemment, cette molécule est en principe apte à interagir avec des protéines impliquées dans la

glycolyse. Les systèmes générateurs d'AscOOH restent complexes; ils sont un mélange de produits d'oxydation de la vitamine C, d'où la nécessité de synthétiser l'AscOOH de façon pure afin de confirmer ses effets propres. En outre, mes résultats n'ont pas permis de confirmer ceux de Knafo *et al.* qui avaient associés l'AscOOH à une hausse de l'activité de l'ACC [4]. En effet, le dosage de l'activité de cette enzyme ne s'avérait pas prometteuse était donné les résultats de TG hépatiques.

Comme nos recherches se fondent sur une situation clinique problématique, il importe de replacer mon projet dans un contexte médical pour le justifier. Ainsi, on se souviendra qu'en clinique : l'incidence de la prématurité et d'un faible poids à la naissance est en croissance; que les jeunes patients touchés sont nourris par HAIV; que l'infusion des solutions d'HAIV (contenant des MV) sans une protection contre la lumière ambiante adéquate est associée à une hausse de l'incidence de complications pathologiques fréquemment rencontrées chez l'enfant prématuré (i.e. cholestase et de dysplasie broncho-pulmonaire); que des molécules oxydantes et de l'AscOOH sont générés dans l'HAIV par interaction entre l'ascorbate, la riboflavine, l'oxygène dissous et la lumière; et finalement que l'enfant prématuré est particulièrement vulnérable face aux espèces redox par une immaturité de ses défenses antioxydantes. Le but premier de mon projet était la mise au point d'un dosage fiable de l'AscOOH, puis en second d'obtenir des indices d'activités biologiques. Chez le cobaye nouveau-né, des effets de l'AscOOH sur le métabolisme hépatique et sur le redox de la circulation se sont fait sentir à des doses débutant autour de 0,5mM équiv. OTC. Ces doses ont été administrées pendant seulement 4 jours. En unité néonatale, nos données indiquent que la concentration d'AscOOH infusée est plus de l'ordre de 0,2mM ou moins, et que la concentration urinaire d'AscOOH chez les enfants prématurés sous HAIV est de l'ordre de quelques centièmes de $\mu\text{mol}/\text{mg}$ créatinine. Or, l'infusion se fait parfois sur de longues périodes : des semaines, voire des mois. De plus, un cochon d'Inde nouveau-né est beaucoup plus mature qu'un enfant nouveau-né, qui lui-même est plus mature qu'un prématuré. On ne connaît pas non plus la sensibilité de l'humain face à ce xénobiotique, par rapport à l'animal. Ainsi, dans le cadre de mon projet, j'ai travaillé avec des doses plus élevées que ce que les enfants reçoivent pour permettre d'établir s'il y a effet ou non. Dans un second temps, mes successeurs devront raffiner la recherche en établissant les seuils de toxicité chez l'animal et chez l'humain, en concentration et en durée, et en précisant les mécanismes physiologiques. Enfin, comme j'en ai fait état dans l'introduction, les solutions d'HAIV sont en plusieurs points

imparfaites, et quelques équipes dans le monde travaillent à perfectionner ce support nutritionnel souvent vital. Au regard de mes résultats, l'étude de l'AscOOH doit maintenant faire partie des stratégies de perfectionnement de l'HAIV.

6. Références

1. Chaudhari, S. and S. Kadam, *Total parenteral nutrition in neonates*. Indian Pediatr, 2006. **43**(11): p. 953-64.
2. Heird, W.C. and M.R. Gomez, *Parenteral Nutrition in Low-Birth-Weight Infants*. Annual Review of Nutrition, 1996. **16**(1): p. 471-499.
3. Btaiche, I.F. and N. Khalidi, *Parenteral nutrition-associated liver complications in children*. Pharmacotherapy, 2002. **22**(2): p. 188-211.
4. Knafo, L., et al., *Association between Hydrogen Peroxide-Dependent Byproducts of Ascorbic Acid and Increased Hepatic Acetyl-CoA Carboxylase Activity*. Clinical Chemistry, 2005. **51**(8): p. 1462-1471.
5. Carter, B.A. and R.J. Shulman, *Mechanisms of disease: update on the molecular etiology and fundamentals of parenteral nutrition associated cholestasis*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2007. **4**(5): p. 277-87.
6. Lavoie, J.-C., et al., *Admixture of a Multivitamin Preparation to Parenteral Nutrition: The Major Contributor to In Vitro Generation of Peroxides*. Pediatrics electronic, 1997. **99**(3): p. E61-E70.
7. Lee, M.D., et al., *Stability of total nutrient admixtures in reference to ambient temperatures*. Nutrition, 2003. **19**(10): p. 886-890.
8. Hofman, P.L., et al., *Premature Birth and Later Insulin Resistance*. N Engl J Med, 2004. **351**(21): p. 2179-2186.
9. Valentine, C.J. and T.D. Puthoff, *Enhancing Parenteral Nutrition Therapy for the Neonate*. Nutr Clin Pract, 2007. **22**(2): p. 183-193.
10. Neu, J., *Gastrointestinal development and meeting the nutritional needs of premature infants*. Am J Clin Nutr, 2007. **85**(2): p. 629S-634.
11. Gura, K.M., et al., *Reversal of Parenteral Nutrition-Associated Liver Disease in Two Infants With Short Bowel Syndrome Using Parenteral Fish Oil: Implications for Future Management*. Pediatrics, 2006. **118**(1): p. e197-201.
12. Jalabert, A., et al., *Évaluation des phénomènes de peroxydation lipidique dans les solutés de nutrition parentérale administrés aux enfants prématurés*. Nutrition Clinique et Métabolisme, 2006. **20**(2): p. 61-67.
13. Shulman, R.J. and S. Phillips, *Parenteral nutrition in infants and children*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2003. **36**(5): p. 587-607.
14. Lucas, A., *Programming by Early Nutrition: An Experimental Approach*. J. Nutr., 1998. **128**(2): p. 401S-.
15. Neu, J., N. Hauser, and M. Douglas-Escobar, *Postnatal nutrition and adult health programming*. Seminars in Fetal and Neonatal Medicine, 2007. **12**(1): p. 78-86.
16. Thomas, B., et al., *Metabolism of Methionine in the Newborn Infant: Response to the Parenteral and Enteral Administration of Nutrients*. Pediatr Res, 2008. **64**(4):381-386.
17. Burdge, G.C. and P.C. Calder, *Lipid metabolism: relevance to developmental origins of health and disease*, in *Developmental Origins of Health and Disease*, P. Gluckman and M. Hanson, Editors. 2006, Cambridge University Press: Cambridge. p. 159-177.
18. Vinnars, E. and F. Hammarqvist, *25th Arvid Wretling's Lecture--Silver anniversary, 25 years with ESPEN, the history of nutrition*. Clinical Nutrition, 2004. **23**(5): p. 955-962.

19. Helbock, H.J., P.A. Motchnik, and B.N. Ames, *Toxic Hydroperoxides in Intravenous Lipid Emulsions Used in Preterm Infants*. Pediatrics, 1993. **91**(1): p. 83-87.
20. Allwood, M.C. and M.C.J. Kearney, *Compatibility and stability of additives in parenteral nutrition admixtures*. Nutrition, 1998. **14**(9): p. 697-706.
21. Sievers, E., et al., *Plasma selenium in preterm and term infants during the first 12 months of life*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2001. **14**(4): p. 218-222.
22. Baydas, G., et al., *Antioxidant Vitamin Levels in Term and Preterm Infants and Their Relation to Maternal Vitamin Status*. Archives of Medical Research, 2002. **33**(3): p. 276-280.
23. Lavoie, J.C., et al., *Influence of lung oxidant and antioxidant status on alveolarization: Role of light-exposed total parenteral nutrition*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(5):572-7.
24. Skouroliakou, M., et al., *Physicochemical Stability of Parenteral Nutrition Supplied as All-in-One for Neonates*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2008. **32**(2): p. 201-209.
25. Silvers, K.M., B.A. Darlow, and C.C. Winterbourn, *Lipid peroxide and hydrogen peroxide formation in parenteral nutrition solutions containing multivitamins*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2001. **25**(1): p. 14-7.
26. Silvers, K.M., et al., *Limiting light-induced lipid peroxidation and vitamin loss in infant parenteral nutrition by adding multivitamin preparations to Intralipid*. Acta Paediatrica, 2001. **90**(3): p. 242-249.
27. Laborie, S., J.C. Lavoie, and P. Chessex, *Paradoxical role of ascorbic acid and riboflavin in solutions of total parenteral nutrition: implication in photoinduced peroxide generation*. Pediatric Research, 1998. **43**(5): p. 601-606.
28. Laborie, S., J.-C. Lavoie, and P. Chessex, *Increased urinary peroxides in newborn infants receiving parenteral nutrition exposed to light*. The Journal of Pediatrics, 2000. **136**(5): p. 628-632.
29. Thomson, A.B. and E.A. Shaffer, *First Principles of Gastroenterology : The Basis of Disease and an Approach to Management*. Second Edition ed. 1994: Canadian Association Pf Gastroenterology / Astra Pharma 587.
30. Kubota, A., et al., *Total parenteral nutrition--associated intrahepatic cholestasis in infants: 25 years' experience*. Journal of Pediatric Surgery, 2000. **35**(7): p. 1049-1051.
31. Beale, E.F., et al., *Intrahepatic Cholestasis Associated with Parenteral Nutrition in Premature Infants*. Pediatrics, 1979. **64**(3): p. 342-347.
32. Robinson, D.T. and R.A. Ehrenkranz, *Parenteral Nutrition-Associated Cholestasis in Small for Gestational Age Infants*. The Journal of Pediatrics, 2008. **152**(1): p. 59-62.
33. Ballatori, N. and A.T. Truong, *Relation between biliary glutathione excretion and bile acid-independent bile flow*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 1989. **256**(1): p. G22-30.
34. Timbrell, J.A., V. Seabra, and C.J. Waterfield, *The in vivo and in vitro protective properties of taurine*. General Pharmacology: The Vascular System, 1995. **26**(3): p. 453-462.
35. Lavoie, J.C., et al., *Reduced bile flow associated with parenteral nutrition is independent of oxidant load and parenteral multivitamins*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2005. **41**(1): p. 108-14.
36. Zambrano, E., et al., *Total Parenteral Nutrition induced Liver Pathology: An Autopsy Series of 24 Newborn Cases*. Pediatric and Developmental Pathology, 2004. **7**(5): p. 425-432.

37. Chessex, P., et al., *Photooxidation of Parenteral Multivitamins Induces Hepatic Steatosis in a Neonatal Guinea Pig Model of Intravenous Nutrition*. Pediatric Research, 2002. **52**(6): p. 958-963.
38. Kelly, D.A., *Liver Complications of Pediatric Parenteral Nutrition--Epidemiology*. Nutrition, 1998. **14**(1): p. 153-157.
39. Premer, D.M. and M.K. Georgieff, *Nutrition for Ill Neonates*. Pediatrics in Review, 1999. **20**(9): p. 56e-62.
40. Saugstad, O.D., *Bronchopulmonary dysplasia--oxidative stress and antioxidants*. Seminars in Neonatology, 2003. **8**(1): p. 39-49.
41. Kinsella, J.P., A. Greenough, and S.H. Abman, *Bronchopulmonary dysplasia*. The Lancet. **367**(9520): p. 1421-1431.
42. Lavoie, J.-C., et al., *Photoprotection prevents TPN-induced lung procollagen mRNA in newborn guinea pigs*. Free Radical Biology and Medicine, 2002. **33**(4): p. 512-520.
43. Lavoie, J.-C., T. Rouleau, and P. Chessex, *Interaction between Ascorbate and Light-Exposed Riboflavin Induces Lung Remodeling*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **311**(2): p. 634-639.
44. Chessex, P., et al., *In Preterm Neonates, is the Risk of Developing Bronchopulmonary Dysplasia Influenced by the Failure to Protect Total Parenteral Nutrition from Exposure to Ambient Light?* The Journal of Pediatrics, 2007. **151**(2): p. 213-214.
45. Godfrey, K.M. and D.J.P. Barker, *Fetal nutrition and adult disease*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2000. **71**(5): p. 1344S-1352.
46. Wang, X., et al., *Glucose and Lipid Metabolism in Small-for-Gestational-Age Infants at 72 Hours of Age*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(2): p. 681-684.
47. McMillen, I.C. and J.S. Robinson, *Developmental Origins of the Metabolic Syndrome: Prediction, Plasticity, and Programming*. Physiol. Rev., 2005. **85**(2): p. 571-633.
48. Gluckman, P.D. and M.A. Hanson, *The developmental origins of the metabolic syndrome*. Trends in Endocrinology and Metabolism, 2004. **15**(4): p. 183-187.
49. Hoppin, A.M.D., *Obesity and the Liver: Developmental Perspectives*. Seminars in Liver Disease, 2004(04): p. 381-387.
50. Jones, P.A. and D. Takai, *The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1068-1070.
51. Vanyushin, B., *DNA methylation and epigenetics*. Russian Journal of Genetics, 2006. **42**(9): p. 985-997.
52. Neuzil, J., et al., *Oxidation of parenteral lipid emulsion by ambient and phototherapy lights: Potential toxicity of routine parenteral feeding*. The Journal of Pediatrics, 1995. **126**(5): p. 785-790.
53. Lavoie, J.-C., et al., *Light-Induced Byproducts of Vitamin C in Multivitamin Solutions*. Clinical Chemistry, 2004. **50**(1): p. 135-140.
54. Brawley, V., J. Bhatia, and W. Karp, *Hydrogen peroxide generation in a model paediatric parenteral amino acid solution*. Clinical Science 1993. **85**: p. 709-712.
55. Bienert, G.P., J.K. Schjoerring, and T.P. Jahn, *Membrane transport of hydrogen peroxide*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2006. **1758**(8): p. 994-1003.
56. Halliwell, B. and S. Chirico, *Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance*. Am J Clin Nutr, 1993. **57**(5): p. 715S-724.
57. Halliwell, B., M.V. Clement, and L.H. Long, *Hydrogen peroxide in the human body*. FEBS Letters, 2000. **486**(1): p. 10-13.
58. Roberts, J.D., R. Stewart, and M.C. Caserio, *Organic Chemistry: Methane to macromolecules*. 1971, California: W.A. Benjamin, Inc. 850p.

59. Forman, H.J., M. Torres, and J. Fukuto, *Redox signaling*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2002. **V234-235**(1): p. 49-62.
60. Djordjevic, V.B. and W.J. Kwang, *Free Radicals in Cell Biology*, in *International Review of Cytology*. 2004, Academic Press. p. 57-89.
61. Pitkanen, O., M. Hallman, and S. Andersson, *Generation of free radicals in lipid emulsion used in parenteral nutrition*. *Pediatr Res*, 1991. **29**(1): p. 56-9.
62. Moore, K. and L.J. Roberts, *Measurement of lipid peroxidation*. *Free Radic Res*, 1998. **28**(6): p. 659-71.
63. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007. **39**(1): p. 44-84.
64. Picaud, J.C., et al., *Lipid peroxidation assessment by malondialdehyde measurement in parenteral nutrition solutions for newborn infants: a pilot study*. *Acta Paediatr*, 2004. **93**(2): p. 241-5.
65. Basu, R., et al., *Free radical formation in infants: The effect of critical illness, parenteral nutrition, and enteral feeding*. *Journal of Pediatric Surgery*, 1999. **34**(7): p. 1091-1095.
66. Padayatty, S.J., et al., *Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention*. *J Am Coll Nutr*, 2003. **22**(1): p. 18-35.
67. Catani, M.V., et al., *Biological Role of Vitamin C in Keratinocytes*. *Nutrition Reviews*, 2005. **63**: p. 81-90.
68. Simpson, G.L.W. and B.J. Ortwerth, *The non-oxidative degradation of ascorbic acid at physiological conditions*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2000. **1501**(1): p. 12-24.
69. Levine, M., A. Katz, and S.J. Padayatty, *Vitamin C*, in *Modern Nutrition in Health and Disease* M.E. Shils, et al., Editors. 2005, Lippincott Williams & Wilkins: New York, NY. p. 507-524.
70. Levine, M., *New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid*. *N Engl J Med*, 1986. **314**(14): p. 892-902.
71. Naidu, K.A., *Vitamin C in human health and disease is still a mystery ? An overview*. *Nutrition Journal*, 2003. **2**(1): p. 7-17.
72. Kramarenko, G.G., et al., *Ascorbate Reacts with Singlet Oxygen to Produce Hydrogen Peroxide*. *Photochemistry and Photobiology*, 2006. **82**(6): p. 1634-1637.
73. Kimoto, E., et al., *Analysis of the Transformation Products of Dehydro-L-Ascorbic Acid by Ion-Pairing High-Performance Liquid Chromatography*. *Analytical Biochemistry*, 1993. **214**(1): p. 38-44.
74. Yuan, J.P. and F. Chen, *Degradation of Ascorbic Acid in Aqueous Solution*. *J. Agric. Food Chem.*, 1998. **46**(12): p. 5078-5082.
75. Deutsch, J.C., et al., *Variation in ascorbic acid oxidation routes in hydrogen peroxide and cupric ion solution as determined by GC/MS*. *Anal. Chem.*, 1994. **66**(3): p. 345-350.
76. Deutsch, J.C., *Ascorbic Acid Oxidation by Hydrogen Peroxide*. *Analytical Biochemistry*, 1998. **255**(1): p. 1-7.
77. Bors, W. and G.R. Buettner, *The Vitamin C Radical and Its Reactions*, in *Vitamin C in Health and Disease*, L. Packer and J. Fuchs, Editors. 1997, Marcel Dekker: New York. 560 p.
78. William, W.W. and X. Dian Peng, *Dehydroascorbate reduction*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 1994. **V26**(4): p. 369-377.
79. Kurata, T. and Y. Nishikawa, *Chemical characteristics of dehydro-L-ascorbic acid*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2000. **64**(8): p. 1651-1655.

80. Pastore, P., et al., *Characterization of dehydroascorbic acid solutions by liquid chromatography/mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2001. **15**(22): p. 2051-7.
81. Cioffi, N., et al., *An electrospray ionization ion trap mass spectrometric (ESI-MS-MSn) study of dehydroascorbic acid hydrolysis at neutral pH*. The Analyst, 2000. **125**(12): p. 2244-2248.
82. Wechtersbach, L. and B. Cigic, *Reduction of dehydroascorbic acid at low pH*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2007. **70**(5): p. 767-772.
83. Otsuka, M., K. Tadao, and N. Arakawa, *Isolation and Characterization of an Intermediate Product in the Degradation of 2,3-Diketo-L-gulonic Acid*. Agricultural and Biological Chemistry, 1986. **50**(2): p. 531-533.
84. Li, M., E. Suzuki, and T. Kurata, *Effects of 2,3-diketo-L-gulonic acid on the oxidation of yolk lipoprotein*. Biosci Biotechnol Biochem, 2001. **65**(3): p. 599-604.
85. Vissers, M.C.M. and R.P. Wilkie, *Ascorbate deficiency results in impaired neutrophil apoptosis and clearance and is associated with up-regulation of hypoxia-inducible factor 1{alpha}*. J Leukoc Biol, 2007: p. jlb.0806541.
86. Nyssönen, K., J.T. Salonen, and M.T. Parviainen, *Ascorbic Acid*, in *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*, A.P. De Leenheer, W.E. Lambert, and J.F. Van Bocxlaer, Editors. 2000, Marcel Dekker New York, 632 p.
87. Wardman, P. and L.P. Candeias, *Fenton Chemistry: An Introduction*. Radiation Research, 1996. **145**(5): p. 523-531.
88. Arrigoni, O. and M.C. De Tullio, *Ascorbic acid: much more than just an antioxidant*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2002. **1569**(1-3): p. 1-9.
89. Chatterjee, I.B., *Evolution and the Biosynthesis of Ascorbic Acid*. Science, 1973. **182**(4118): p. 1271-1272.
90. Wilson, J.X., *REGULATION OF VITAMIN C TRANSPORT*. Annual Review of Nutrition, 2005. **25**(1): p. 105-125.
91. Koshiishi, I., et al., *Degradation of dehydroascorbate to 2,3-diketogulonate in blood circulation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1998. **1425**(1): p. 209-214.
92. Vera, J.C., et al., *Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid*. Nature, 1993. **364**(6432): p. 79-82.
93. Koshiishi, I., Y. Mamura, and T. Imanari, *Bicarbonate promotes a cleavage of lactone ring of dehydroascorbate*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1379**(2): p. 257-63.
94. Duarte, T.L. and J. Lunec, *Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C*. Free Radical Research, 2005. **39**(7): p. 671-686.
95. Gorman, S.R., et al., *Scarcity in the midst of plenty: enteral tube feeding complicated by scurvy*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2002. **35**(1): p. 93-5.
96. Powers, H.J., *Riboflavin (vitamin B-2) and health*. American Journal of Clinical Nutrition, 2003. **77**(6): p. 1352-1360.
97. McCormick, D.B., *Riboflavin*, in *Modern Nutrition in Health and Disease* M.E. Shils, et al., Editors. 2005, Lippincott Williams & Wilkins: New York, NY. p. 434-441.
98. Nielsen, P., *Flavins*, in *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*, A.P. De Leenheer, W.E. Lambert, and J.F. Van Bocxlaer, Editors. 2000, Marcel Dekker: New York. 632 p.
99. Edwards, A.M. and E. Silva, *Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2001. **63**(1-3): p. 126-131.

100. Massey, V., *The chemical and biological versatility of riboflavin*. Biochem Soc Trans, 2000. **28**(4): p. 283-96.
101. Min, D.B. and J.M. Boff, *Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2002. **1**: p. 58-72.
102. Heelis, P.F., *The photophysical and photochemical properties of flavins (isoalloxazines)*. Chem. Soc. Rev., 1982. **11**: p. 15 - 39.
103. Jung, M.Y., S.K. Kim, and S.Y. Kim, *Riboflavin-sensitized photooxidation of ascorbic acid: kinetics and amino acid effects*. Food Chemistry, 1995. **53**(4): p. 397-403.
104. Kim, H., et al., *Photosensitized formation of ascorbate radicals by riboflavin: an ESR study*. Photochem Photobiol, 1993. **57**(5): p. 777-84.
105. Cardoso, D.R., K. Olsen, and L.H. Skibsted, *Mechanism of deactivation of triplet-excited riboflavin by ascorbate, carotenoids, and tocopherols in homogeneous and heterogeneous aqueous food model systems*. J Agric Food Chem, 2007. **55**(15): p. 6285-91.
106. Rochette, A.d.L., et al., *Riboflavin Photodegradation and Photosensitizing Effects are Highly Dependent on Oxygen and Ascorbate Concentrations*. Photochemistry and Photobiology, 2000. **72**(6): p. 815-820.
107. Minami, H., et al., *Hypoxia Potentiates Ultraviolet A-Induced Riboflavin Cytotoxicity*. 1999. **113**(1): p. 77-81.
108. Huang, R., H.J. Kim, and D.B. Min, *Photosensitizing Effect of Riboflavin, Lumiflavin, and Lumichrome on the Generation of Volatiles in Soy Milk*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(6): p. 2359-2364.
109. García, J. and E. Silva, *Flavin-sensitized photooxidation of amino acids present in a parenteral nutrition infusate: Protection by ascorbic acid*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 1997. **8**(6): p. 341-345.
110. Silva, E., A.M. Edwards, and D. Pacheco, *Visible light-induced photooxidation of glucose sensitized by riboflavin*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 1999. **10**(3): p. 181-185.
111. Buettner, G.R. and M.J. Need, *Hydrogen peroxide and hydroxyl free radical production by hematoporphyrin derivative, ascorbate and light*. Cancer Lett, 1985. **25**(3): p. 297-304.
112. Weiss, S.J., P.K. Rustagi, and A.F. LoBuglio, *Human granulocyte generation of hydroxyl radical*. J. Exp. Med., 1978. **147**(2): p. 316-323.
113. Clark, D.E., *Peroxides and peroxide-forming compounds*. Chemical Health and Safety, 2001. **8**(5): p. 12-22.
114. Lavoie, J.-C., C. Lachance, and P. Chessex, *Antiperoxide activity of sodium metabisulfite : A double-edged sword*. Biochemical Pharmacology, 1994. **47**(5): p. 871-876.
115. Bergendi, L., et al., *Chemistry, physiology and pathology of free radicals*. Life Sciences, 1999. **65**(18-19): p. 1865-1874.
116. Bayr, H., *Reactive oxygen species. [Miscellaneous Article]*. Critical Care Medicine Cellular and Molecular Biology for Intensivists: A Primer., 2005. **33**(12): p. S498-S501.
117. Jefferies, H., et al., *Glutathione*. ANZ J Surg, 2003. **73**(7): p. 517-22.
118. Schafer, F.Q. and G.R. Buettner, *Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple*. Free Radical Biology and Medicine, 2001. **30**(11): p. 1191-1212.
119. Negre-Salvayre, A., et al., *Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors*. Br J Pharmacol, 2007. **153**(1): p. 6-20.

120. Nitti, M., et al., *Activation of PKC-[beta] isoforms mediates HNE-induced MCP-1 release by macrophages*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. **294**(3): p. 547-552.
121. Caselli, A., et al., *The Inactivation Mechanism of Low Molecular Weight Phosphotyrosine-protein Phosphatase by H2O2*. J. Biol. Chem., 1998. **273**(49): p. 32554-32560.
122. Siegel, G.J., et al., *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th Edition ed. 1998, New York: Lippincott Williams and Wilkins. 1183 pages.
123. Song, Y., et al., *Roles of Hydrogen Peroxide in Thyroid Physiology and Disease*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(10): p. 3764-3773.
124. Prasad, R.K. and F. Ismail-Beigi, *Mechanism of Stimulation of Glucose Transport by H2O2: Role of Phospholipase C*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1999. **362**(1): p. 113-122.
125. May, J.M. and C. de Haen, *The insulin-like effect of hydrogen peroxide on pathways of lipid synthesis in rat adipocytes*. J. Biol. Chem., 1979. **254**(18): p. 9017-9021.
126. Patricia Greenwel, J.-A.D.-R.G.M.A.M.R.-E.M.R., *Hydrogen peroxide: A link between acetaldehyde-elicited α 1(i) collagen gene up-regulation and oxidative stress in mouse hepatic stellate cells*. Hepatology, 2000. **31**(1): p. 109-116.
127. Thannickal, V.J. and B.L. Fanburg, *Reactive oxygen species in cell signaling*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(6): p. L1005-1028.
128. Rhee, S.G., *Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger*. Exp Mol Med, 1999. **31**(2): p. 53-9.
129. Veal, E.A., A.M. Day, and B.A. Morgan, *Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling*. Molecular Cell, 2007. **26**(1): p. 1-14.
130. Hasenkopf, K., et al., *Analysis of Glycated and Ascorbylated Proteins by Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. J. Agric. Food Chem., 2002. **50**(20): p. 5697-5703.
131. Stocchi, V., et al., *Inactivation of Rabbit Red Blood Cell Hexokinase Activity Promoted in Vitro by an Oxygen-Radical-Generating System*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1994. **311**(1): p. 160-167.
132. Rivière, J., J.-L. Ravanat, and J.R. Wagner, *Ascorbate and H2O2 induced oxidative DNA damage in Jurkat cells*. Free Radical Biology and Medicine, 2006. **40**(12): p. 2071-2079.
133. Ahola, T., et al., *Thiol metabolism in preterm infants during the first week of life*. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 2004. **64**(7): p. 649 - 658.
134. Fujino, G., et al., *Thioredoxin and protein kinases in redox signaling*. Seminars in Cancer Biology, 2006. **16**(6): p. 427-435.
135. Lee, Y.S. and Y.H. Chou, *Antioxidant profiles in full term and preterm neonates*. Chang Gung Med J, 2005. **28**(12): p. 846-51.
136. Lavoie, J.-C. and P. Chessex, *Gender and Maturation Affect Glutathione Status in Human Neonatal Tissues*. Free Radical Biology and Medicine, 1997. **23**(4): p. 648-657.
137. Pastore, A., et al., *Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification*. Clinica Chimica Acta, 2003. **333**(1): p. 19-39.
138. Leung, F.Y., *Trace elements that act as antioxidants in parenteral micronutrition*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 1998. **9**(6): p. 304-307.
139. Hofmann, B., H.J. Hecht, and L. FlohÄ©, *Peroxiredoxins*. Biological Chemistry, 2002. **383**(3-4): p. 347.

140. Winterbourn, C.C. and A. Stern, *Human red cells scavenge extracellular hydrogen peroxide and inhibit formation of hypochlorous acid and hydroxyl radical*. J Clin Invest, 1987. **80**(5): p. 1486-91.
141. Traber, M.G., *Vitamin E*, in *Modern Nutrition in Health and Disease*, M.E. Shils, et al., Editors. 2005, Lippincott Williams & Wilkins: New York, NY. p. 396-411.
142. Palace, V.P., et al., *Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease*. Free Radical Biology and Medicine, 1999. **26**(5-6): p. 746-761.
143. Buonocore, G., et al., *Oxidative stress in preterm neonates at birth and on the seventh day of life*. Pediatr Res, 2002. **52**(1): p. 46-9.
144. Frank, L. and I.R. Sosenko, *Prenatal development of lung antioxidant enzymes in four species*. J Pediatr, 1987. **110**(1): p. 106-10.
145. Darlow, B.A., et al., *The Relationship of Selenium Status to Respiratory Outcome in the Very Low Birth Weight Infant*. Pediatrics, 1995. **96**(2): p. 314-319.
146. Bracci, R. and G. Buonocore, *The antioxidant status of erythrocytes in preterm and term infants*. Seminars in Neonatology, 1998. **3**(3): p. 191-197.
147. Jones, P.E. and C.R. Mc, *Enzyme activities in the blood of infants and adults*. Biochem J, 1949. **45**(4): p. 464-7.
148. Weickert, M. and A. Pfeiffer, *Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism*. Diabetologia, 2006. **49**(8): p. 1732-1741.
149. Salway, J.G., *Medical Biochemistry At a Glance*. 2nd Edition ed. At a Glance. 2006 Blackwell Publishing Professional
150. Berg, J.M., et al., *Biochemistry*. 5th Edition ed. 2002, New York: W. H. Freeman and Company. 974 pages.
151. Dolinsky, V.W., et al., *Triacylglycerol hydrolase: role in intracellular lipid metabolism*. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS), 2004. **61**(13): p. 1633-1651.
152. Athenstaedt, K. and G. Daum, *The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation*. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS), 2006. **63**(12): p. 1355-1369.
153. Böhme, H.J., G. Sparmann, and E. Hofmann, *Biochemistry of liver development in the perinatal period*. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS), 1983. **39**(5): p. 473-483.
154. Lehner, R., Z. Cui, and D.E. Vance, *Subcellular localization, developmental expression and characterization of a liver triacylglycerol hydrolase*. Biochem J, 1999. **338** (Pt 3): p. 761-8.
155. Gaussin, V., et al., *Distinct type-2A protein phosphatases activate HMGCoA reductase and acetyl-CoA carboxylase in liver*. FEBS Letters, 1997. **413**(1): p. 115-118.
156. Gaussin, V., et al., *Activation of hepatic acetyl-CoA carboxylase by glutamate and Mg²⁺ is mediated by protein phosphatase-2A*. Biochem J, 1996. **316** (Pt 1): p. 217-24.
157. Brownsey, R.W., et al., *Regulation of acetyl-CoA carboxylase*. Biochem. Soc. Trans., 2006. **34**(Pt 2): p. 223-227.
158. Rao, R.K. and L.W. Clayton, *Regulation of protein phosphatase 2A by hydrogen peroxide and glutathionylation*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. **293**(1): p. 610-616.
159. Humphries, K.M. and L.I. Szweda, *Selective Inactivation of (alpha)-Ketoglutarate Dehydrogenase and Pyruvate Dehydrogenase: Reaction of Lipoic Acid with 4-Hydroxy-2-nonenal*. Biochemistry, 1998. **37**(45): p. 15835-15841.
160. Chang, S., et al., *Exogenous low dose hydrogen peroxide increases hypoxia-inducible factor-1alpha protein expression and induces preconditioning protection against*

- ischemia in primary cortical neurons*. Neuroscience Letters, 2008. **441**(1): p. 134-138.
161. Katz, A., *Modulation of glucose transport in skeletal muscle by reactive oxygen species*. J Appl Physiol, 2007. **102**(4): p. 1671-1676.
162. Na, S.I., et al., *Hydrogen peroxide increases [3H]-2-deoxyglucose uptake via MAPKs, cPLA2, and NF-kappaB signaling pathways in mouse embryonic stem cells*. Cell Physiol Biochem, 2007. **20**(6): p. 1007-18.
163. Niessen, W.M.A., *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. 3rd Edition ed. Chromatographic Science Series, ed. J. Cazes. 2006, Boca Raton: CRC Press. 608 pages.
164. Lim, C.K. and T.J. Peters, *Ammonium acetate: A general purpose buffer for clinical applications of high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1984. **316**: p. 397-406.
165. Annesley, T.M., *Ion Suppression in Mass Spectrometry*. Clinical Chemistry, 2003. **49**(7): p. 1041-1044.
166. de Hoffman, E. and V. Stroobant, *MASS SPECTROMETRY - Principles and Applications*. Second Edition ed. 2002, Chichester: John Wiley & Sons Ltd. 407 p.
167. Deutsch, J.C., *Oxygen-Accepting Antioxidants Which Arise during Ascorbate Oxidation*. Analytical Biochemistry, 1998. **265**(2): p. 238-245.
168. Stokvis, E., H. Rosing, and J.H. Beijnen, *Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not?* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005. **19**(3): p. 401-407.
169. Knafo, L., *Association entre les produits issus de la dégradation de la vitamine C, dépendante du H2O2, et le métabolisme des lipides hépatiques*, in *Sciences biomédicales*. 2005, Université de Montréal: Montréal. p. 95.
170. Frenich, A.G., et al., *Determination of Ascorbic Acid and Carotenoids in Food Commodities by Liquid Chromatography with Mass Spectrometry Detection*. J. Agric. Food Chem., 2005. **53**(19): p. 7371-7376.
171. Hamilton, B.E., et al., *Annual Summary of Vital Statistics: 2005*. Pediatrics, 2007. **119**(2): p. 345-360.
172. Vial, J. and A. Jardy, *Experimental Comparison of the Different Approaches To Estimate LOD and LOQ of an HPLC Method*. Anal. Chem., 1999. **71**(14): p. 2672-2677.
173. Kuhara, T., *Diagnosis of inborn errors of metabolism using filter paper urine, urease treatment, isotope dilution and gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2001. **758**(1): p. 3-25.
174. Comeaux, L.M., et al., *LC-MS/MS detection of monosaccharides from yeast selected for xylose consumption*, in *Proceedings of the 54th ASMS Conference*. 2006: Seattle, WA.
175. Fukagawa, N.K., E. Hercules, and A.M. Ajami, *L-2-[13C]oxothiazolidine-4-carboxylic acid: a probe for precursor mobilization for glutathione synthesis*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **278**(1): p. E171-176.
176. Maclaren, J.A., *2-Oxothiazolidine-4-Carboxylic Acid And Related Substances*. Aust J Chem, 1968. **21**: p. 1891-96.
177. D. B. Josephson, R.C.L.D.A.S., *Bisulfite Suppression of Fish Aromas*. Journal of Food Science, 1983. **48**(4): p. 1064-1067.
178. Watson, A.D., et al., *Structural Identification of a Novel Pro-inflammatory Epoxyisoprostane Phospholipid in Mildly Oxidized Low Density Lipoprotein*. J. Biol. Chem., 1999. **274**(35): p. 24787-24798.

179. Nourooz-Zadeh, J., J. Tajaddini-Sarmadi, and S.P. Wolff, *Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylene orange assay in conjunction with triphenylphosphine*. Anal Biochem, 1994. **220**(2): p. 403-9.
180. Banerjee, D., et al., *Measurement of plasma hydroperoxide concentration by FOX-1 assay in conjunction with triphenylphosphine*. Clinica Chimica Acta, 2003. **337**(1-2): p. 147-152.
181. Chessex, P., et al., *Parenteral multivitamin supplementation induces both oxidant and antioxidant responses in the liver of newborn guinea pigs*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2001. **32**(3): p. 316-21.
182. Lavoie, J.-C., et al., *Peroxide-like oxidant response in lungs of newborn guinea pigs following the parenteral infusion of a multivitamin preparation*. Biochemical Pharmacology, 2000. **60**(9): p. 1297-1303.
183. Lavoie, J.C., M. Spalinger, and P. Chessex, *Glutathione synthetic activity in the lungs in newborn guinea pigs*. Lung, 1999. **177**(1): p. 1-7.
184. Fernandez, M.L., *Guinea Pigs as Models for Cholesterol and Lipoprotein Metabolism*. J. Nutr., 2001. **131**(1): p. 10-20.
185. Carter, A.M., *Animal Models of Human Placentation - A Review*. Placenta, 2007. **28**(Supplement 1): p. S41-S47.
186. D'Erchia, A.M., et al., *The guinea-pig is not a rodent*. Nature, 1996. **381**(6583): p. 597-600.
187. Asikainen, T.M. and C.W. White, *Antioxidant defenses in the preterm lung: role for hypoxia-inducible factors in BPD?* Toxicology and Applied Pharmacology, 2005. **203**(2): p. 177-188.
188. Rickett, G.M. and F.J. Kelly, *Developmental expression of antioxidant enzymes in guinea pig lung and liver*. Development, 1990. **108**(2): p. 331-336.
189. Kind, K.L., et al., *Restricted fetal growth and the response to dietary cholesterol in the guinea pig*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 1999. **277**(6): p. R1675-1682.
190. Ge, T.-F., et al., *Gatifloxacin affects GLUT1 gene expression and disturbs glucose homeostasis in vitro*. European Journal of Pharmacology, 2007. **573**(1-3): p. 70-74.
191. Long, L.H., P.J. Evans, and B. Halliwell, *Hydrogen Peroxide in Human Urine: Implications for Antioxidant Defense and Redox Regulation*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999. **262**(3): p. 605-609.
192. Stoscheck, C.M., *Quantitation of protein*. Methods Enzymol, 1990. **182**: p. 50-68.
193. Viau, C., M. Lafontaine, and J.P. Payan, *Creatinine normalization in biological monitoring revisited: the case of 1-hydroxypyrene*. International Archives of Occupational and Environmental Health, 2004. **77**(3): p. 177-185.
194. *Technical Bulletin No 6080E*, in *Method of analysis with Beckman*, Beckman-Instruments, Editor. 1961.
195. Bergmeyer, H.U., et al., *D-Glucose*, in *Methods of enzymatic analysis*, H.U. Bergmeyer, Editor. 1974, Weinheim : Verlag Chemie: New York, NY. p. 1196-1201.
196. Kemp, A. and A.J. Van Heijningen, *A colorimetric micro-method for the determination of glycogen in tissues*. Biochem J, 1954. **56**(4): p. 646-8.
197. Gauthier, C., *La nutrition parentérale modifie le statut et le potentiel redox du glutathion hépatique chez le modèle néonatal du cochon d'Inde*, in *Sciences biomédicales*. 2004, Université de Montréal: Montréal. p. 110.
198. Rahman, I., A. Kode, and S.K. Biswas, *Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 3159-65.
199. Griffey, R.H., H. Sasmor, and M.J. Greig, *Oligonucleotide charge states in negative ionization electrospray-mass spectrometry are a function of solution ammonium ion*

- concentration*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1997. **8**(2): p. 155-160.
200. Kebbekus, B. and S. Mitra, *Environmental Chemical Analysis* 1998, Boca Raton: CRC Press. 344 pages.
201. Bhatia, J., L.D. Stegink, and E.E. Ziegler, *Riboflavin enhances photo-oxidation of amino acids under simulated clinical conditions*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1983. **7**(3): p. 277-279.
202. Giustarini, D., et al., *Red blood cells as a physiological source of glutathione for extracellular fluids*. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2008. **40**(2): p. 174-179.
203. Minnich, V., et al., *Glutathione biosynthesis in human erythrocytes. I. Identification of the enzymes of glutathione synthesis in hemolysates*. J Clin Invest, 1971. **50**(3): p. 507-13.
204. Vitvitsky, V., et al., *Redox regulation of homocysteine-dependent glutathione synthesis*. Redox Rep, 2003. **8**(1): p. 57-63.
205. Banerjee, R. and C.-g. Zou, *Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine-[beta]-synthase: a PLP-dependent hemesensor protein*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2005. **433**(1): p. 144-156.
206. Nkabyo, Y.S., et al., *Extracellular cysteine/cystine redox regulates the p44/p42 MAPK pathway by metalloproteinase-dependent epidermal growth factor receptor signaling*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **289**(1): p. G70-78.
207. Moriarty-Craige, S.E. and D.P. Jones, *EXTRACELLULAR THIOLS AND THIOL/DISULFIDE REDOX IN METABOLISM*. Annual Review of Nutrition, 2004. **24**(1): p. 481-509.
208. Helms, R.A., R.W. Chesney, and M.C. Storm, *Sulfur amino acid metabolism in infants on parenteral nutrition*. Clinical Nutrition, 1995. **14**(6): p. 381-387.
209. Rao, A.M., M.R. Drake, and M.H. Stipanuk, *Role of the Transsulfuration Pathway and of {gamma}-Cystathionase Activity in the Formation of Cysteine and Sulfate from Methionine in Rat Hepatocytes*. J. Nutr., 1990. **120**(8): p. 837-845.

ANNEXE I

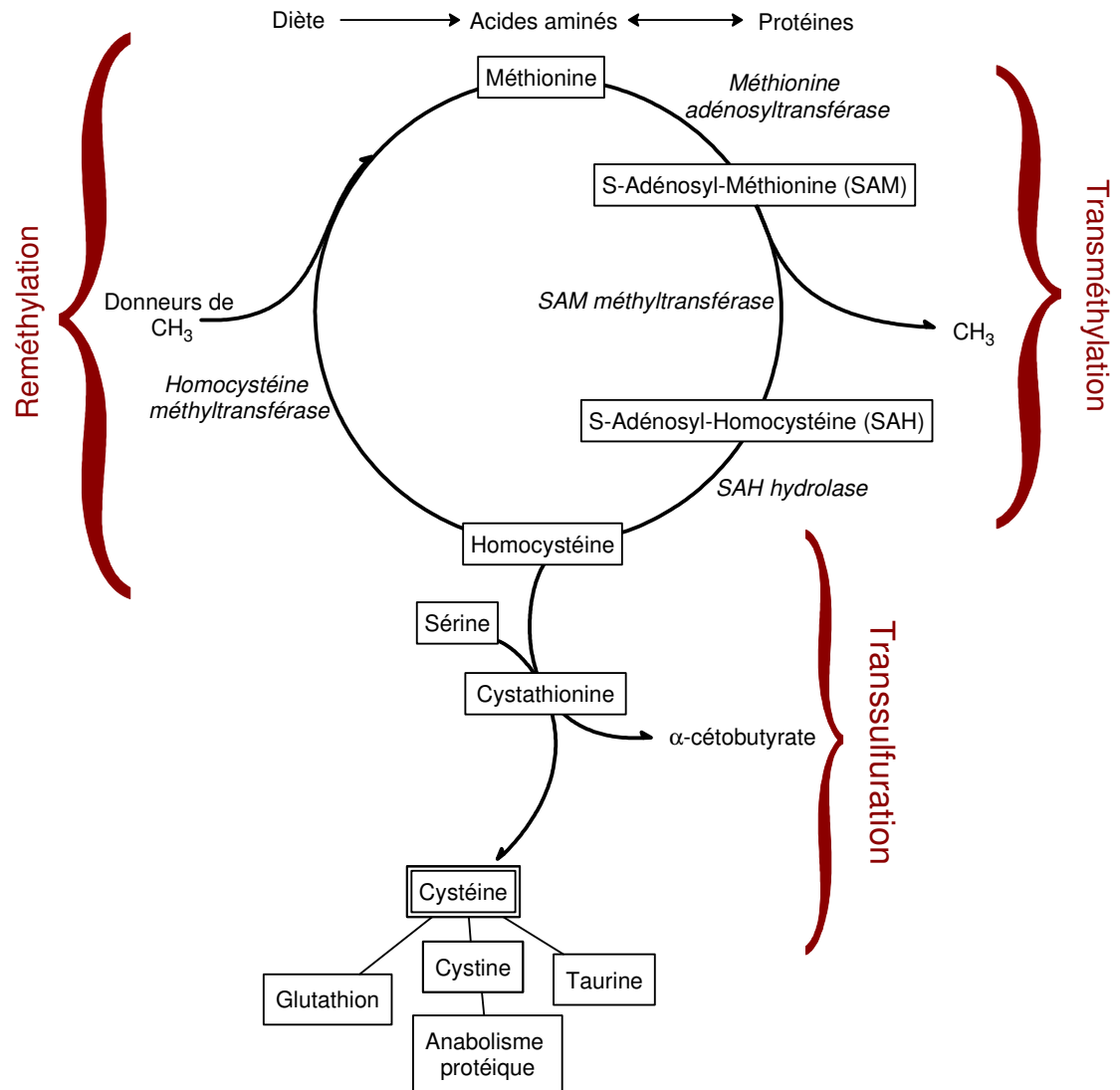


FIGURE 58. Métabolisme de la méthionine *in vivo*. Les enzymes apparaissent en italique [16, 208, 209].

ANNEXE II

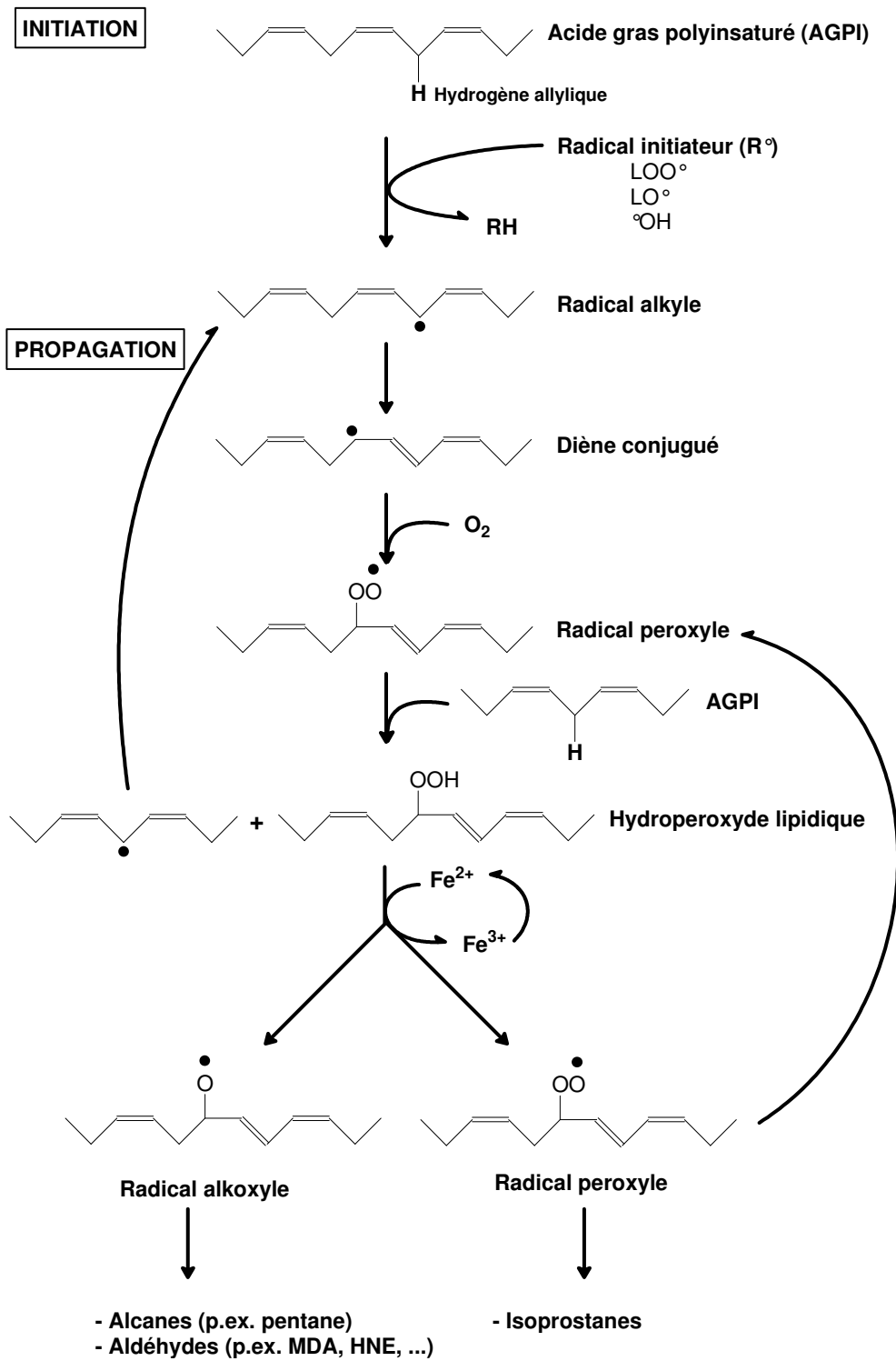


FIGURE 59. Peroxydation lipidique, adapté de [62, 122].

ANNEXE III

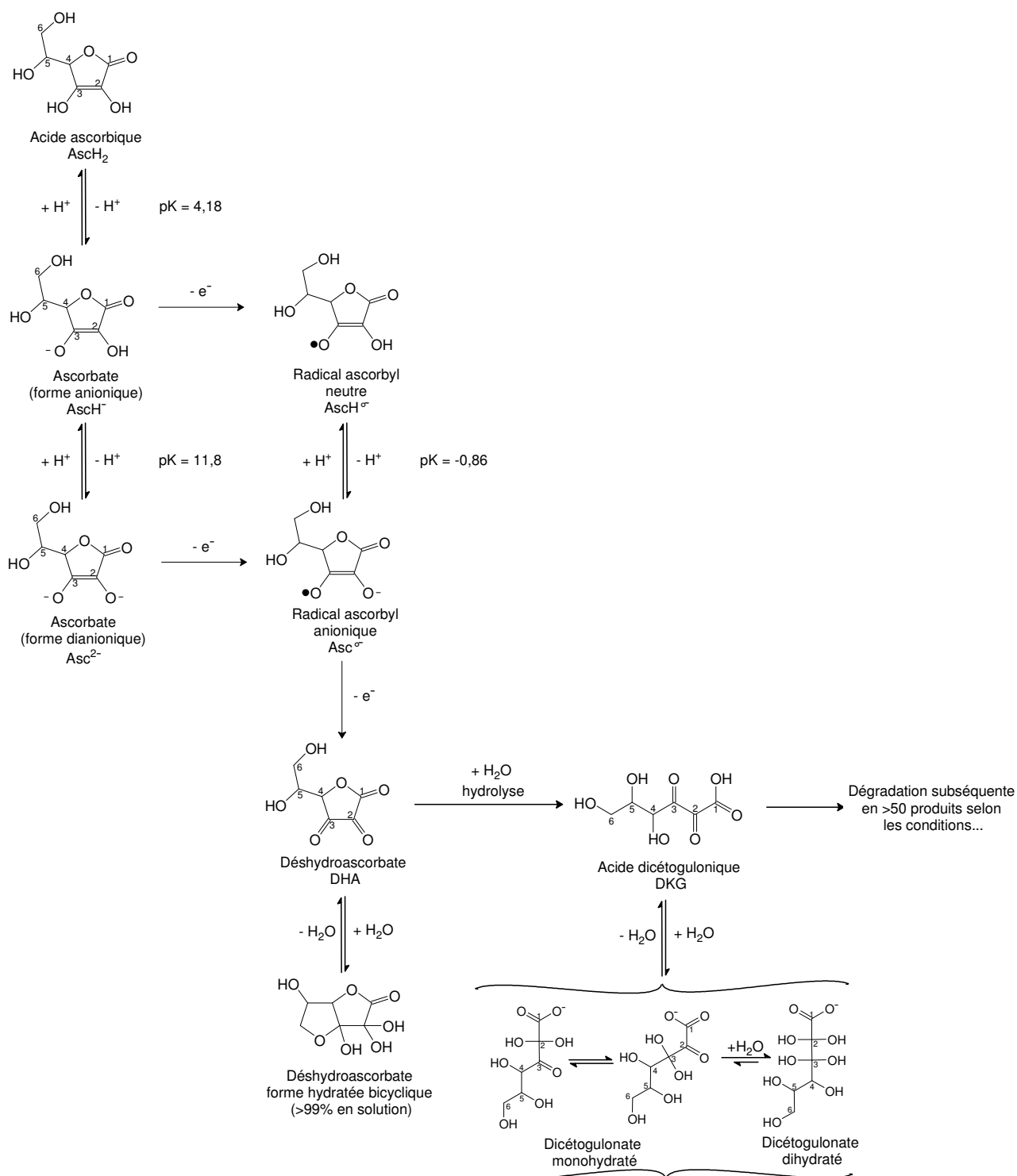


FIGURE 60. Premières étapes de l'oxydation de l'acide ascorbique et les principaux produits de dégradation, adapté de [69, 76, 77, 81].

ANNEXE IV

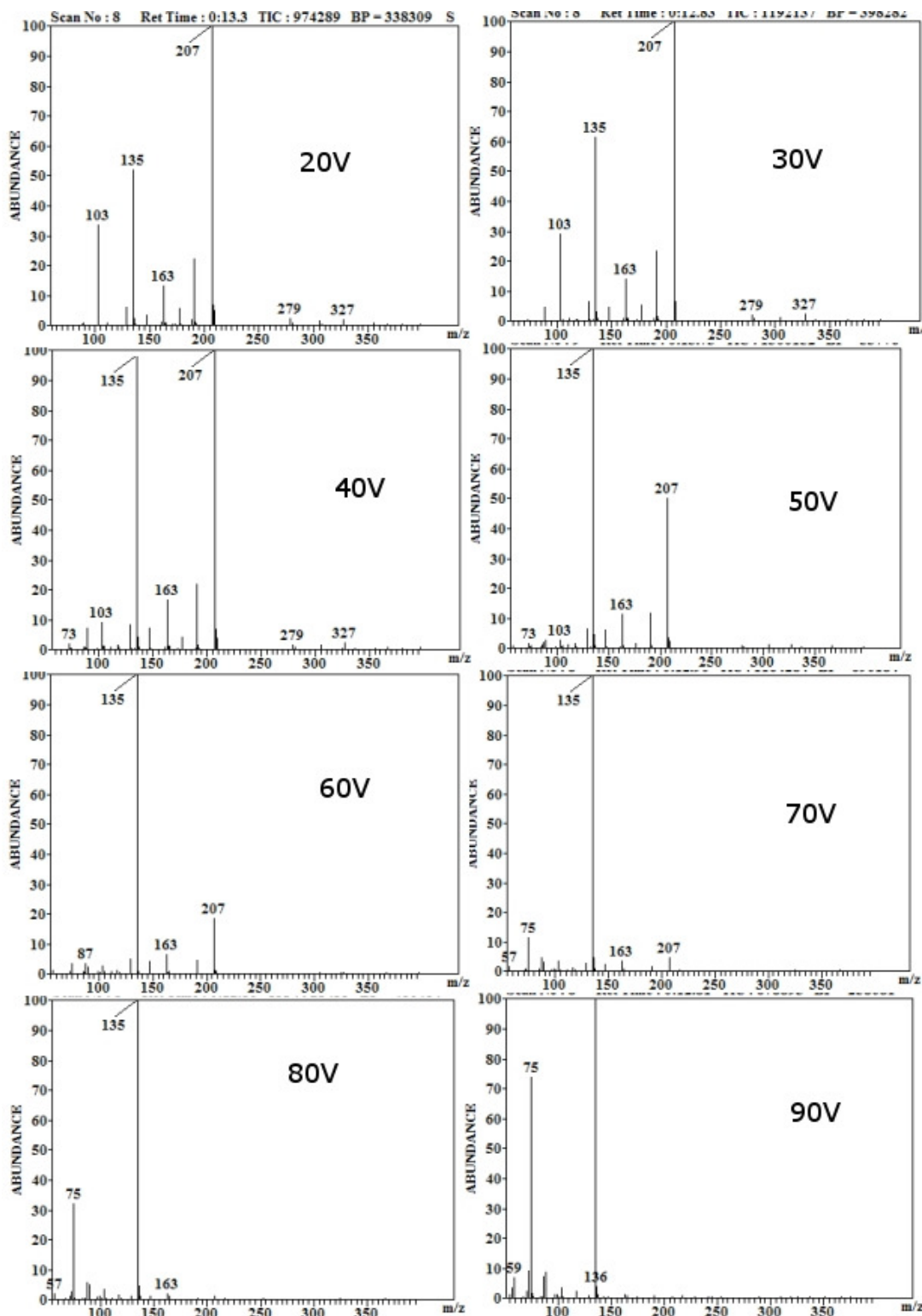


FIGURE 61. Effet du voltage de fragmentation sur le scan au LC-MS d'un système générateur.

ANNEXE V

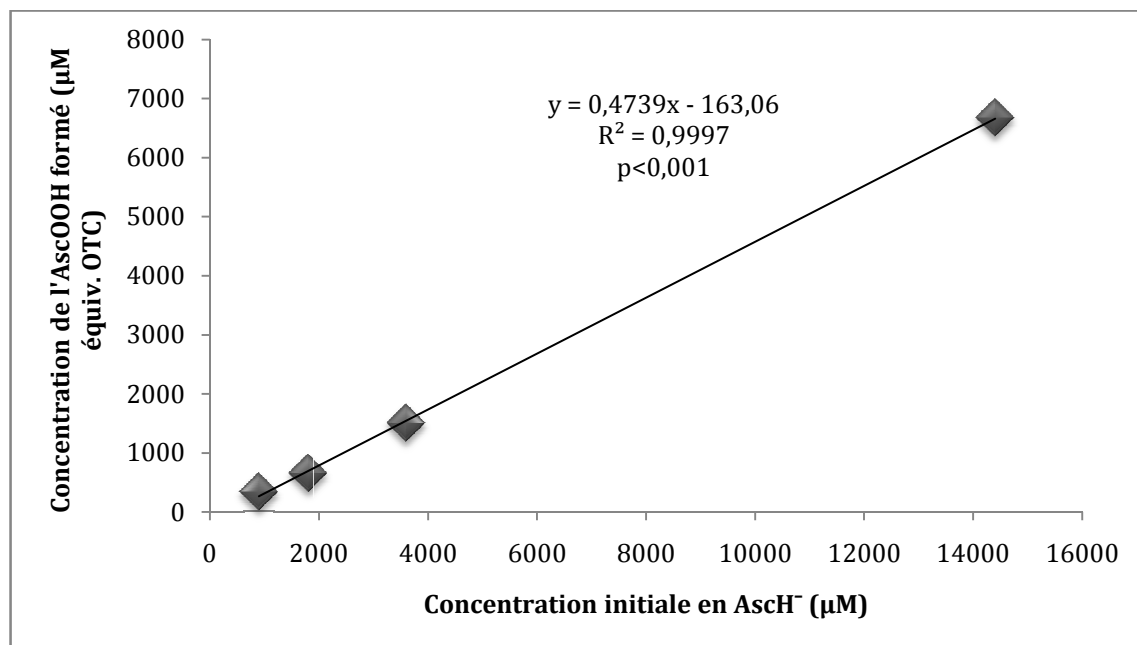


FIGURE 62. AscOOH généré par rapport à la concentration initiale d'AscH⁻ présente dans différents systèmes générateurs préparés en janvier 2007.